

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Ralf S. Müller

Therapie der caninen atopischen Dermatitis mit rekombinantem  
felinem Interferon- $\omega$ : Evaluierung der Bildung neutralisierender  
Antikörper und Vergleich der Wirksamkeit der oralen und  
subkutanen Verabreichung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Petra Birgit Litzlbauer  
aus München

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Müller

Korreferent: Prof. Dr. Kaltner

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meinen Eltern.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Atopische Dermatitis .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Ätiologie und Pathogenese .....	3
1.2.	Klinik .....	12
1.3.	Diagnose .....	13
1.4.	Therapie .....	14
1.4.1.	Symptomatische Therapie.....	15
1.4.1.1.	Glukokortikoide .....	15
1.4.1.2.	Calcineurin-Inhibitoren.....	17
1.4.1.3.	Antihistaminika.....	19
1.4.1.4.	Essentielle Fettsäuren .....	21
1.4.1.5.	Shampootherapie .....	22
1.4.2.	ASIT.....	23
<b>2.</b>	<b>Interferon.....</b>	<b>24</b>
2.1.	Induktion und Wirkungsweise der Interferone .....	25
2.2.	Orale Verabreichung von Interferon.....	28
2.3.	Interferone in der Humanmedizin.....	30
2.4.	Interferone in der Kleintiermedizin .....	32
2.5.	Interferontherapie der atopischen Dermatitis .....	33
2.5.1.	Humanmedizin.....	33
2.5.2.	Tiermedizin.....	35
2.6.	Nebenwirkungen der Interferontherapie .....	37
2.6.1.	Humanmedizin.....	37
2.6.2.	Tiermedizin.....	38
2.7.	Interferontherapie und Antikörperbildung .....	39
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>41</b>
<b>1.</b>	<b>Studiendesign .....</b>	<b>41</b>
<b>2.</b>	<b>Patienten .....</b>	<b>41</b>
<b>3.</b>	<b>Zusätzliche Therapeutika .....</b>	<b>42</b>

<b>4.</b>	<b>Ausschlusskriterien .....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>Intervention.....</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>Klinische Untersuchungen, Dokumentation .....</b>	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>Labordiagnostik .....</b>	<b>45</b>
7.1.	Enzyme linked immunosorbent essay (ELISA) .....	45
7.2.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	47
7.3.	Massenspektrometrie.....	47
<b>8.</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
<b>1.</b>	<b>Patienten.....</b>	<b>49</b>
1.1.	Nebenwirkungen .....	50
1.2.	Allergien.....	51
1.3.	Eliminationsdiät .....	51
1.4.	Begleitende Therapien außerhalb des Medication Score .....	52
1.4.1.	Pyodermien und Antibiotika bei Studienbeginn .....	52
1.5.	Ausnahmen.....	53
<b>2.</b>	<b>Klinische Daten.....</b>	<b>54</b>
2.1.	CADESI .....	54
2.2.	Juckreizskala (Pruritus Score).....	60
2.3.	Medication Score.....	66
2.4.	Gesamtscore .....	70
2.5.	Global Assessment .....	76
2.6.	Lebensqualität .....	80
<b>3.</b>	<b>Labordiagnostik .....</b>	<b>83</b>
3.1.	Antikörpernachweis mittels ELISA .....	83
3.2.	SDS-PAGE.....	88
3.3.	Massenspektrometrie.....	89
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>90</b>
<b>1.</b>	<b>Wirksamkeit der Behandlung von CAD mit rFeIFN-<math>\omega</math> im Gruppenvergleich.....</b>	<b>90</b>
1.1.	Patienten .....	90
1.2.	Klinische Daten .....	95

---

1.3.	Wirksamkeit der subkutanen Behandlung von CAD mit rFeIFN- $\omega$ .....	97
1.4.	Wirksamkeit der oralen Behandlung von CAD mit rFeIFN- $\omega$ .....	102
<b>2.</b>	<b>Bildung von Antikörpern gegen rFeIFN-<math>\omega</math> bei Hunden mit CAD....</b>	<b>104</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>111</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>113</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>115</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>161</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>176</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

®	registered trade mark = geschützte Marke
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
0,9 % NaCl	0,9%ige Natriumchloridlösung (= physiologische Kochsalzlösung)
AD	atopische Dermatitis
ANA	anti-nukleäre Antikörper
ASIT	allergen-spezifische Immuntherapie
AST	Aspartat-Aminotransferase (ein Leberenzym)
AZT	Azidothymidin (3'-azido-3'-deoxythymidine triphosphate)
bid	bis in die (lat.) = zweimal täglich
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	canine atopic dermatitis = canine atopische Dermatitis
CADESI	Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index
CML	chronische myeloische Leukämie
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ET	essentielle Thrombozythämie
et al.	et alii/et aliae/et alia (lat.) = und andere
etc.	et cetera (lat.) = und so weiter

evtl.	eventuell
FeLV	felines Leukämie Virus
FHV	felines Herpesvirus
FIP	feline infektiöse Peritonitis
FIV	felines Immundefizienz Virus
ggr.	geringgradig
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor = Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
H	Histamin
H1-Rezeptor	Histamin-1-Rezeptor
H2-Rezeptor	Histamin-2-Rezeptor
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
H4-Rezeptor	Histamin-4-Rezeptor
HuIFN	humanes Interferon
I.E.	internationale Einheiten
IFN	Interferon(e)
IFNAR	Interferon-alpha-Rezeptor
IFNGR	Interferon-gamma-Rezeptor
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IL-12Rβ1	Interleukin-12 Rezeptor β1
IL-12Rβ2	Interleukin-12 Rezeptor β2



---

inkl.	inklusive
IRF	interferon regulatory factors = Interferon-Regulationsfaktoren
ISG	interferon-stimulated genes = Interferon-stimulierte Gene
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LDDS-Test	Low-Dose Dexamethasone Suppression Test = niedrig dosierter Dexamethason Suppressions Test
M	Molar (= 1 Mol/Liter)
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
mM	Millimolar (= 1 Millimol/Liter)
MPN	myeloproliferative Neoplasien
mRNA	messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	multiple Sklerose
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid (= Kochsalz)
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer

PBMC	peripheral blood mononuclear cells  = mononukleäre Zellen im peripheren Blut
PBS	phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween
PegIFN	pegyliertes Interferon
pH	potentia Hydrogenii oder pondus Hydrogenii (lat.)  = negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PV	Polyzythämia vera
rCaIFN	rekombinantes canines Interferon
rFeIFN	rekombinantes felines Interferon
rHuIFN	rekombinantes humanes Interferon
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RRMS	relapsing/remitting multiple sclerosis  = schubförmig remittierende multiple Sklerose
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction  = Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s.c.	subcutaneous = subkutan
SA	Standardabweichung
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sid	semel in die (lat.) = einmal täglich
spp.	species pluralis (lat.) = mehrere Spezies
STAT	signal transducers and activators of transcription  = Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription  (ein Transkriptionsfaktor)

---

TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$ = Transformierender Wachstumsfaktor
Th1	T1-Helferzellen
Th2	T2-Helferzellen
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor(en)
TLR	toll-like receptor = Toll-ähnlicher Rezeptor
TYK	Tyrosinkinase
USA	United States of America = Vereinigte Staaten von Amerika
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil



## I. EINLEITUNG

Die canine atopische Dermatitis (CAD), eine allergische Hauterkrankung mit genetischem Hintergrund (HALLIWELL, 2006), betrifft bereits ca. 10 % aller Hunde (HILLIER & GRIFFIN, 2001b; SCOTT et al., 2001). Eine steigende Prävalenz wird vermutet (HILLIER & GRIFFIN, 2001b). Neben genetischen Faktoren (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008) und Umwelteinflüssen (SINKE et al., 2002) spielt vor allem eine veränderte Immunantwort eine große Rolle in der Pathogenese der CAD (SINKE et al., 2002). Im Gegensatz zu gesunden Hunden überwiegt bei Hunden mit CAD initial die Immunantwort der T2-Helferzellen (Th2) (OLIVRY et al., 1999; HILL & OLIVRY, 2001; NUTTALL et al., 2002).

Die momentan einzige spezifische Therapie der CAD ist die allergen-spezifische Immuntherapie (ASIT). Leider ist diese Therapie nur bei ca. 60 % der Hunde wirksam und kann selten schwerwiegende Nebenwirkungen auslösen (NUTTALL et al., 1998; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Neben der ASIT besteht die Therapie der CAD aus einer Kombination von symptomatischen antipruritischen und antiinflammatorischen Medikamenten wie Glukokortikoiden, Cyclosporinen, Antihistaminika und essentiellen Fettsäuren, wobei die wirksamsten Medikamente auch das größte Nebenwirkungspotential haben (OLIVRY et al., 2010b). Daher wird kontinuierlich nach neuen Therapieoptionen geforscht, die bei hoher Wirksamkeit ein möglichst geringes Potential für Nebenwirkungen haben.

Interferon (IFN) ist ein natürlicher Botenstoff des Immunsystems, mit vielfältigen Wirkungen (BORDEN et al., 2007). Aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften, vor allem der Rolle, die IFN bei der Induktion einer überwiegend T1-Helferzell (Th1)-vermittelten Immunantwort spielt, hat es das Potential, neben der ASIT zur zweiten spezifischen Therapie der CAD zu werden. Sowohl rekombinantes canines IFN- $\gamma$  (rCaIFN- $\gamma$ ) als auch rekombinantes felines IFN- $\omega$  (rFeIFN- $\omega$ ) zeigten in verschiedenen Studien nach subkutaner (s.c.) Applikation eine sehr gute Wirksamkeit bei der Behandlung der CAD mit nur sehr wenigen und milden Nebenwirkungen (HASEGAWA et al., 2004; IWASAKI, 2004; IWASAKI & HASEGAWA, 2006; CARLOTTI et al., 2009; YASUKAWA et al., 2010). RFeIFN- $\omega$  ist in Europa das einzige in der Tiermedizin zugelassene IFN.

Da bekannt ist, dass sich nach s.c. Applikation von speziesfremdem IFN neutralisierende Antikörper bilden können, die die Therapie unwirksam machen (ZEIDNER et al., 1990), und es zur Behandlung von CAD mit rFeIFN- $\omega$  noch keine Langzeiterfahrungen gibt (CARLOTTI et al., 2009), könnte es auch bei Hunden zur Bildung neutralisierender Antikörper gegen das feline IFN kommen.

Nach oraler Verabreichung von speziesfremdem IFN wurde bislang noch keine Bildung von Antikörpern festgestellt (GILGER et al., 1999; SATOH et al., 1999; NAKAJIMA & SOKAWA, 2002). Die Effektivität von oral verabreichtem IFN bei CAD wurde jedoch noch nicht untersucht.

Ziel der hier vorliegenden Studie war es, herauszufinden, ob die subkutane oder die orale Verabreichung von rFeIFN- $\omega$  bei einer Langzeittherapie von Hunden mit atopischer Dermatitis (AD) zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern führt. Zusätzlich sollte die Wirksamkeit der oralen und subkutanen rFeIFN- $\omega$ -Therapie von Hunden mit AD in einer offenen klinischen Studie verglichen werden.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Atopische Dermatitis**

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine entzündliche und juckende, allergische Hauterkrankung bei Mensch und Hund (SEHGAL & JAIN, 1993; HALLIWELL, 2006). Sie ist sowohl in der humanmedizinischen als auch in der veterinärmedizinischen Praxis von großer Bedeutung. Beim Menschen wurde in den letzten Jahrzehnten eine steigende Inzidenz und Prävalenz bewiesen (SCHULTZ LARSEN et al., 1996; SUGIURA et al., 1998), beim Hund wird das ebenfalls vermutet, auch wenn leider keine verlässlichen epidemiologischen Daten dazu vorliegen (HILLIER & GRIFFIN, 2001b). Derzeit leiden ca. 10 % der Hundepopulation an AD, die genauen Angaben über die Prävalenz beim Hund variieren jedoch (SCOTT & PARADIS, 1990; HILLIER & GRIFFIN, 2001b; SCOTT et al., 2001).

#### **1.1. Ätiologie und Pathogenese**

Bei der AD handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung. Einer der zur Entstehung der AD beitragenden Faktoren ist eine genetische Prädisposition. Beim Menschen sind mehrere Genmutationen bekannt, die bei der AD eine Rolle spielen. Anfangs beschäftigten sich die meisten Studien mit Genen, die für die veränderte immunologische Reaktion bei Atopikern verantwortlich sind, wobei Polymorphismen verschiedener Gene für Zytokine, die Bestandteil des adaptiven Immunsystems sind, entdeckt wurden. Dazu gehören z.B. Gene für Interleukin (IL)-4 bzw. den IL-4-Rezeptor und IL-13 (LEUNG, 1999; NOVAK et al., 2002; HE et al., 2003; BUSSMANN et al., 2011). Dabei handelt es sich um Zytokine der Th2, die bei Menschen mit AD vermehrt exprimiert werden. Ferner gibt es Hinweise auf Mutationen des IL-12-Rezeptors, die dazu führen, dass die Induktion von IFN- $\gamma$  durch IL-12 nicht oder nur unzureichend funktioniert (MATSUI et al., 1999). IL-12 und IFN- $\gamma$  sind beides wichtige Zytokine für die Induktion einer Th1-vermittelten Immunantwort. In einzelnen Studien konnte auch ein Zusammenhang zwischen Atopie und Genvarianten von Bestandteilen des angeborenen Immunsystems festgestellt werden (WEIDINGER et al., 2005; MRABET-DAHBI et al., 2008; BUSSMANN et al., 2011). In jüngerer Zeit beschäftigt sich die Forschung v.a. mit Genen, die für die Zusammensetzung und

Aufrechterhaltung einer intakten Hautbarriere verantwortlich sind. Dabei wurde nachgewiesen, dass bestimmte Mutationen des Filaggrin-Gens für die Entstehung der AD mitverantwortlich sind (PALMER et al., 2006; WEIDINGER et al., 2006; BUSSMANN et al., 2011). Filaggrin ist ein Protein, das für eine intakte Hautbarriere und damit den Schutz des Individuums vor dem Eindringen von Pathogenen, Schadstoffen und Allergenen von entscheidender Bedeutung ist (DALE et al., 1978; SCOTT & HARDING, 1981; STEINERT et al., 1981; RAWLINGS et al., 1994; RAWLINGS & HARDING, 2004; SANDILANDS et al., 2009). LESIAK und Mitarbeiter (2011) konnten ein erhöhtes Atopie-Risiko bei Menschen feststellen, bei denen sowohl Mutationen des Filaggrin-Gens als auch Polymorphismen für IL-10 und IL-13 vorlagen (LESIK et al., 2011).

Auch beim Hund ist bekannt, dass die Genetik eine Rolle spielen muss, da man in verschiedenen Studien eine eindeutige Rasseprädisposition für CAD nachweisen konnte (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; SOUSA & MARSELLA, 2001; TARPATAKI et al., 2006; JAEGER et al., 2010). Die beteiligten Gene sind bei weitem noch nicht so gut erforscht wie in der Humanmedizin, es konnten jedoch schon verschiedene Kandidatengene identifiziert werden, die bei atopischen Hunden im Vergleich zu gesunden Hunden über- oder unterexprimiert sind und teilweise mit der Hautbarriere, teilweise mit der Immunantwort in Zusammenhang stehen (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2008). Was die Filaggrin-Mutationen angeht, so konnte bisher in Studien zwar gezeigt werden, dass bei atopischen Hunden der Anteil an Filaggrin in der Haut im Vergleich zu gesunden Hunden vermindert ist, ob es sich dabei aber um ein primäres Geschehen, ausgelöst durch Genmutationen, oder um ein rein sekundäres Geschehen, ausgelöst durch die Entzündung handelt, ist noch ungeklärt (MARSELLA et al., 2009; CHERVET et al., 2010; MARSELLA et al., 2011; OLIVRY, 2011). In einer Studie wurde in der Haut von manchen atopischen Hunden die Expression von Filaggrin-Protein ohne Carboxy-terminales Ende nachgewiesen, was auf eine Genmutation mit resultierendem Funktionsverlust hinweisen könnte (CHERVET et al., 2010), die Genmutation selbst wurde jedoch noch nicht nachgewiesen.

Es wird allgemein angenommen, dass eine genetische Prädisposition allein nicht ausreicht, um eine Allergie zu entwickeln, sondern, dass die Umwelt auch eine große Rolle spielt (SINKE et al., 2002). Bei vorhandener genetischer Prädisposition, im Zusammenspiel mit geeigneten Umweltbedingungen, wie z.B.



einer frühzeitigen und wiederholten Allergenexposition, aber auch evtl. einer verminderten Infektionshäufigkeit und Parasiteninfestation (STRACHAN, 1989; SINKE et al., 2002), kommt es dann zu einer veränderten Immunantwort.

Die Unterschiede der immunologischen Reaktionen bei Menschen mit AD im Vergleich zu gesunden Menschen sind vielfältig. Meist liegt initial eine verringerte Immunantwort der Th1 und eine vermehrte Immunantwort der Th2, also eine vermehrt humorale und vermindert zelluläre Immunantwort vor. Zusätzlich besteht häufig eine Eosinophilie (VAN REIJSEN et al., 1992; LEUNG, 1999; SINKE et al., 2002). Th1 und Th2 stellen verschiedene Untergruppen der CD4+-Helferzellen dar und sind durch eine unterschiedliche Zytokinproduktion charakterisiert. Die Th2 produzieren überwiegend IL-4, IL-5 und IL-13. Diese Zytokine lösen die humorale Immunantwort mit überschießender Immunglobulin E (IgE)-Produktion durch B-Lymphozyten aus, welche für Allergien typisch ist, und aktivieren eosinophile Granulozyten. Die Th1 produzieren vorwiegend IL-12 und IFN- $\gamma$ , welche zu einer überwiegend zellvermittelten Immunantwort und zur Bildung von Antikörpern der Klasse IgG führen (MOSMANN et al., 1986; JUJO et al., 1992; KAPLAN & KUNA, 1998; VAN DER BRUGGEN et al., 1998; LEUNG, 1999; TOMPKINS, 1999; HILL & OLIVRY, 2001). Diese unterschiedliche Zytokinexpression konnte im peripheren Blut und in der Haut von Menschen mit AD festgestellt werden (REINHOLD et al., 1990; VAN DER HEIJDEN et al., 1991; JUJO et al., 1992; RENZ et al., 1992; AKDIS et al., 1997; LEUNG, 1999). In nicht betroffenen Hautarealen und in Hautarealen mit akuten Läsionen wurde vermehrt IL-4 und IL-13, nicht aber IFN- $\gamma$  exprimiert. In Hautarealen mit chronischen Läsionen wurde vergleichsweise weniger IL-4 exprimiert, dafür aber vermehrt IL-12 und IFN- $\gamma$ , was darauf schließen lässt, dass in chronischen Läsionen wieder ein Wechsel zu einer Th1-vermittelten Immunantwort stattfindet, während in der akuten Phase die Th2-Immunantwort dominiert (HAMID et al., 1994; HAMID et al., 1996; LEUNG, 1999). In chronischen Läsionen konnten auch mehr eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden, als in akuten Läsionen (HAMID et al., 1994). Welche Immunantwort stattfindet, wird unter anderem durch die Zytokine beeinflusst, die bei der Antigenpräsentation durch Langerhans Zellen und dendritische Zellen anwesend sind. Dabei spielen IL-12, und der IL-12-Rezeptor eine wichtige Rolle für die Induktion von IFN- $\gamma$  und der Th1-Immunantwort. Es sind zwei Subtypen

des IL-12-Rezeptors bekannt, die IL-12 Rezeptor  $\beta 1$  (IL-12R $\beta 1$ )-Komponente und die IL-12 Rezeptor  $\beta 2$  (IL-12R $\beta 2$ )-Komponente, die unabhängig voneinander mit niedriger Affinität IL-12 binden. Werden sie gemeinsam exprimiert, steigt die Bindungsaffinität. Die IL-12R $\beta 2$ -Komponente vermittelt die Signaltransduktion und wird, im Gegensatz zur IL-12R $\beta 1$ -Komponente, selektiv auf Th1 exprimiert. Die Expression der IL-12R $\beta 2$ -Komponente des IL-12-Rezeptors wird durch IFN- $\alpha$  sowie auch durch IL-12 selbst induziert, während IL-4 die Expression hemmt. Ist also während der Antigenpräsentation vermehrt IFN- $\alpha$  und/oder IL-12 vorhanden, so führt dies über eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Expression zu einer Th1-Immunantwort. Diese führt wiederum zu einer weiteren Steigerung der IFN- $\gamma$  Produktion bei gleichzeitig verringerter IL-4 Produktion. Bei überwiegender IL-4-Präsenz während der Antigenpräsentation, wie z.B. bei Menschen mit AD, ist eine Th2-Immunantwort die Folge (FINKELMAN et al., 1991; PARRONCHI et al., 1992; ROGGE et al., 1997; LEUNG, 1999; MATSUI et al., 1999; TOMPKINS, 1999). Interessanterweise konnten GREWE und Mitarbeiter (1998) in einer *in vitro* Studie nachweisen, dass eosinophile Granulozyten von Menschen mit AD nach Stimulation mit Th2-Zytokinen IL-12 produzieren, welches wiederum die Produktion von IFN- $\gamma$  durch Th1 induziert. Demnach könnte die durch die allergische Th2 Immunreaktion ausgelöste Infiltration von eosinophilen Granulozyten in die Haut von Atopikern den oben beschriebenen Wechsel zu einer Th1 Immunantwort in chronischen Läsionen verursachen (GREWE et al., 1998).

Die vorwiegend Th2-vermittelte Immunantwort bei Menschen mit AD führt zu einer gesteigerten Produktion von allergen-spezifischen Antikörpern der Klasse IgE. Diese Antikörper besetzen spezielle Rezeptoren, die sogenannten Fc $\epsilon$ -Rezeptoren, an zahlreichen Zellen in der Haut, wie z.B. antigenpräsentierenden Langerhans Zellen, Makrophagen, aber auch an Mastzellen (LEUNG et al., 1987; LEUNG, 1999; AMIN, 2012), sodass sie an der Antigenpräsentation beteiligt sind, aber auch an der Mastzelldegranulation. Zur Mastzelldegranulation kommt es, wenn mastzellgebundenes IgE durch die entsprechenden Allergene quervernetzt wird. Dabei werden proinflammatorische Mediatoren und Zytokine freigesetzt, die wahrscheinlich an der für die Allergie typischen juckenden Entzündungsreaktion der Haut beteiligt sind und die Infiltration weiterer Entzündungszellen in die Haut auslösen, die wiederum

Entzündungsmediatoren freisetzen und die Inflammation so in Gang halten (ISHIZAKA et al., 1972; ISHIZAKA et al., 1983; LEUNG, 1999; SINKE et al., 2002; SIRAGANIAN, 2003; AMIN, 2012).

Bei der CAD ist die Rolle der verschiedenen Unterarten der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen noch bei weitem nicht so gut erforscht wie beim Menschen (HILL & OLIVRY, 2001). Eine qualitative Untersuchung zeigte zwar, dass Biopsieproben von der Haut atopischer Hunde mit Läsionen mehr mRNA von IL-4 und IL-5 enthielten, als z.B. mRNA von IL-2, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. In derselben Studie wurde in signifikant mehr Proben von gesunder Haut mRNA von IL-2 und IL-12p40 nachgewiesen, IFN- $\gamma$ -mRNA war jedoch bei beiden in gleichem Maß vorhanden, wobei erwähnenswert ist, dass vier von fünf Proben von Hunden mit CAD, in denen mRNA von IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden konnte, von demselben Hund mit chronischen Hautläsionen stammten (OLIVRY et al., 1999) und deswegen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden sollten. NUTTALL und Mitarbeiter führten drei Jahre später erneut eine Studie durch, in der der Gehalt an Zytokin-mRNA in der Haut von atopischen Hunden und von gesunden Kontrollhunden verglichen wurde (NUTTALL et al., 2002). Im Unterschied zu der Studie von OLIVRY und Mitarbeitern (1999) wurde hier eine semi-quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Diese Studie zeigte signifikant mehr IL-4 mRNA in Haut von Hunden mit CAD im Vergleich zu Haut von gesunden Hunden. Interessanterweise war die Transkription von IL-2, IFN- $\gamma$  und Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ , alles Zytokine der Th1-Immunantwort, in Hautläsionen von Hunden mit CAD ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu Haut von gesunden Hunden. Es ist allerdings nicht angegeben, ob es sich bei diesen Läsionen um akute oder chronische Läsionen handelte und die Transkription ebendieser Zytokine war in läsionsfreier Haut von Hunden mit CAD niedriger als bei gesunden Hunden. Es könnte sich dabei also um den bereits in der Humanmedizin bekannten Wechsel zur Th1-Immunantwort in chronischen Läsionen handeln. Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass zu Beginn in der akuten Phase bei atopischen Hunden wie bei Menschen eine Th2-Immunantwort überwiegt, und dass bei chronischen Fällen ebenfalls ein Wechsel zu einer Th1-Immunantwort stattfindet. Zu beachten ist dabei, dass mRNA nachgewiesen wurde. Inwieweit eine Translation stattfindet, und welche Mengen der einzelnen Zytokine tatsächlich vorhanden sind, ist nicht

bekannt (OLIVRY et al., 1999; NUTTALL et al., 2002).

Mastzellen spielen bei der CAD ebenfalls eine Rolle, auch wenn noch unklar ist, wie bedeutend diese Rolle ist (HILL & OLIVRY, 2001). Sie sind beim Hund hauptsächlich in der oberflächlichen Dermis zu finden und nicht gleichmäßig über den Körper verteilt. Die meisten Mastzellen finden sich an den Pinnae und den ventralen Pfoten, beides Prädispositionsstellen der CAD (AUXILIA & HILL, 2000). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass IgE auch bei Hunden an Mastzellen bindet (HALLIWELL, 1973; OLIVRY et al., 1996). Durch Quervernetzung von mastzellgebundenem IgE kommt es zur Mastzelldegranulation, wobei es Hinweise gibt, dass Mastzellen von Hunden mit CAD mehr Histamin enthalten und nach Stimulation auch mehr Histamin freisetzen (DEMORA et al., 1996), welches an der nachfolgenden Entzündungsreaktion beteiligt ist (HILL & OLIVRY, 2001). Neben den Mastzellen besetzen IgE auch, wie beim Menschen, Rezeptoren an antigenpräsentierenden dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen, die v.a. in läsionaler Haut von Hunden mit CAD in signifikant höherer Anzahl vorliegen als bei gesunden Kontrollhunden (OLIVRY et al., 1996). IgE scheint also auch bei CAD, genauso wie bei humaner AD, eine große Rolle zu spielen. Eine Tatsache, die wiederum auf eine überwiegende Th2-Immunantwort hindeutet.

Auch eosinophile Granulozyten sind, wie beim Menschen, bei Hunden mit CAD im Vergleich zu gesunden Hunden vermehrt in der Haut nachzuweisen. Vor allem in läsionaler Dermis und Epidermis sind sowohl intakte Eosinophile als auch freie Granula nachzuweisen, daher scheinen sie eine Rolle in der Pathogenese der CAD zu spielen (OLIVRY et al., 1997). Diese Eosinophilen könnten sogar noch eine größere Rolle spielen als bisher angenommen, da eosinophiles kationisches Protein und "Major basic protein", die von Eosinophilen sezerniert werden und für viele der Wirkungen verantwortlich sind, nicht in normalen Färbungen nachgewiesen werden (HILL & OLIVRY, 2001).

All diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass der CAD die gleichen Pathomechanismen zugrunde liegen wie humaner AD, es sind jedoch weitere und umfassendere Untersuchungen nötig, um diese Aussage abschließend bestätigen zu können (OLIVRY et al., 1996; OLIVRY et al., 1999; NUTTALL et al., 2002).

Neben den genetischen, immunvermittelten und umweltbedingten Faktoren spielt

jedoch auch die Haut selbst eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AD. In Studien wurde gezeigt, dass die Hautbarriere bei atopischen Menschen und Hunden auch an Stellen ohne Läsionen gestört ist (MARSELLA et al., 2011). Dabei ist nicht nur, wie bereits bei der Genetik angesprochen, der Filaggrin-Anteil in der Haut vermindert. In verschiedenen Studien ist auch der Anteil an bestimmten Ceramiden im Stratum corneum der Epidermis bei atopischen im Vergleich zu gesunden Menschen und Hunden erniedrigt (IMOKAWA et al., 1991; REITER et al., 2009; SHIMADA et al., 2009). Ceramide spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Hautbarriere (SWEENEY & DOWNING, 1970; ELIAS, 1983; GEILEN et al., 1997; CHOI & MAIBACH, 2005; MARSELLA et al., 2011). Bei Menschen mit AD war in einer Studie auch der Anteil an Sphingosinen, einem weiteren natürlichen Bestandteil der Hautbarriere mit antibakterieller Wirkung, erniedrigt (ARIKAWA et al., 2002). Die Folge dieser Veränderungen ist ein erhöhter Wasserverlust durch die Haut und somit eine trockene Haut (IMOKAWA et al., 1991; SHIMADA et al., 2009). Desweiteren ist die Haut bei Menschen und Hunden mit AD anfälliger für wiederkehrende Infektionen durch Bakterien, v.a. *Staphylococcus spp.* (beim Menschen in der Regel *Staphylococcus aureus*, beim Hund in der Regel *Staphylococcus pseudintermedius*), und Malassezien, die sich, wahrscheinlich aufgrund der geschwächten Hautbarriere und den immunologischen Veränderungen, viel leichter auf der Haut ansiedeln können (LEYDEN et al., 1974; NIMMO WILKIE et al., 1991; MCEWAN, 2000; DEBOER & MARSELLA, 2001; ARIKAWA et al., 2002; SIMOU et al., 2005; FAZAKERLEY et al., 2009). Durch die Infektion und durch die von den Mikroorganismen freigesetzten Toxine wird die Entzündung der Haut verschlimmert und die Hautbarriere weiter geschwächt (EZEPCHUK et al., 1996; ZOLLNER et al., 2000; DEBOER & MARSELLA, 2001; NIEBUHR et al., 2011). Es existieren Studien, die die Vermutung nahelegen, dass gewisse Oberflächenproteine und Toxine der Mikroorganismen selbst als Allergene fungieren und somit einen allergischen Schub auslösen können (LEUNG et al., 1993; MORALES et al., 1994; MORRIS et al., 1998; TENGVALL LINDER et al., 2000; DEBOER & MARSELLA, 2001).

Eine weitere mögliche Folge der gestörten Hautbarriere ist, dass die Allergene direkt über die Haut in den Organismus gelangen können. Dies wurde in einer

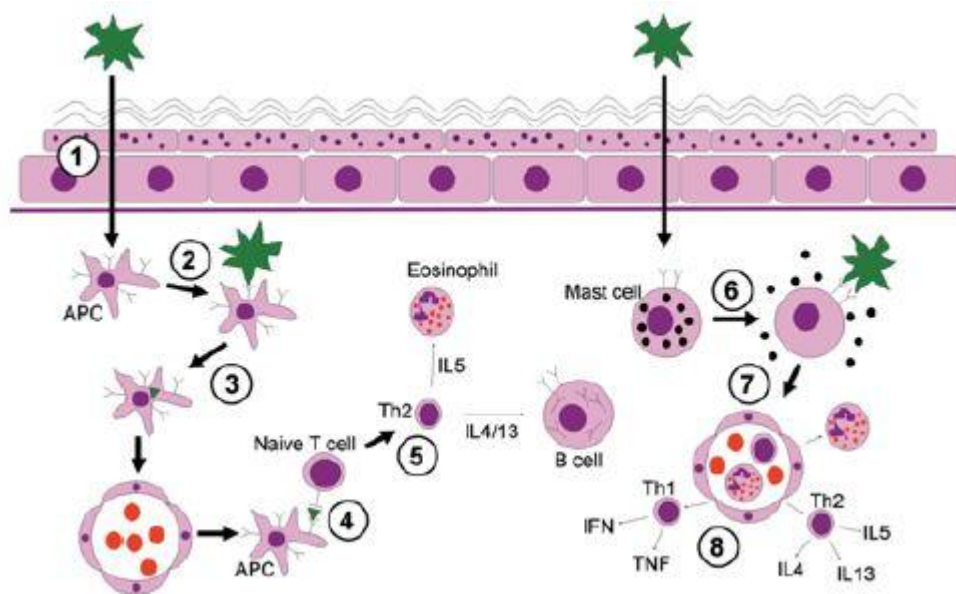
Patch-Test-Studie bestätigt, bei der die entsprechenden Allergene direkt auf die Haut aufgebracht wurden und so bei allergischen, aber nicht bei gesunden Hunden zu einer allergischen Reaktion in Form einer Quaddelbildung führten (NOGUEIRA et al., 2005). Evtl. entsteht die Allergie erst aufgrund der gestörten Hautbarriere, indem durch die Allergenaufnahme durch die Haut eine Sensibilisierung stattfindet (FALLON et al., 2009; BUSSMANN et al., 2011; OLIVRY et al., 2011). Die Allergene können jedoch auch über den Atmungs- oder Verdauungstrakt in den Blutkreislauf und somit in die Haut gelangen (MARSELLA et al., 2006). Lange Zeit sah man Inhalation allein als den Weg an, über den die Allergene in die Haut gelangen (WITTICH, 1941; PATTERSON, 1960; GOLD et al., 1972; PATTERSON et al., 1974; OLIVRY & HILL, 2001), eine Vielzahl von Studien demonstrierte jedoch die Bedeutung der transepidermalen Allergenaufnahme (OLIVRY et al., 1996; OLIVRY et al., 1997; OLIVRY & HILL, 2001; NOGUEIRA et al., 2005; MARSELLA et al., 2006; OLIVRY et al., 2011).

Die verantwortlichen Allergene können unterschiedlicher Herkunft sein. Sie können aus der Umwelt stammen, wie z.B. Hausstaubmilben oder Gräserpollen, oder es kann sich dabei um Futter- bzw. Nahrungsbestandteile handeln. Beim Hund ist die CAD definiert als "eine genetisch prädisponierte, entzündliche und juckende allergische Hauterkrankung mit charakteristischen klinischen Merkmalen, assoziiert mit IgE-Antikörpern, meistens gegen Umweltallergene gerichtet" (HALLIWELL, 2006). Diese Definition beinhaltet demnach auch allergische Hauterkrankungen gegen andere Allergene als Umweltallergene, wie z.B. Futtermittelallergene. Es gibt momentan noch einige Kontroversen, ob der durch Futtermittelallergene ausgelösten allergischen Hauterkrankung, die sich klinisch genauso präsentiert wie die durch Umweltallergene ausgelöste CAD, wirklich auch dieselben Pathomechanismen zugrunde liegen (HILLIER & GRIFFIN, 2001a; OLIVRY et al., 2007a). Um Unklarheiten zu vermeiden, kann man den Begriff „CAD sensu lato“ für die durch Umwelt- und Futtermittelallergene verursachte allergische Hauterkrankung und für die speziell nur durch Umweltallergene ausgelöste, allergische Hauterkrankung den Begriff „CAD sensu stricto“ verwenden (PICCO et al., 2008).

Es sollte nicht unerwähnt bleiben, dass seit kurzem auch eine Form von CAD bekannt ist, bei der keine IgE-Antikörper nachweisbar sind. Man hat sich deshalb

auf die Bezeichnung "atopic-like dermatitis" geeinigt (HALLIWELL, 2006). Auf diese Erkrankung soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden.

Die folgende Abbildung (Abbildung 1) soll die Mechanismen der Pathogenese der AD in ihrer Gesamtheit veranschaulichen: Aufgrund der gestörten Hautbarriere können Allergene in die Haut eindringen (1). Dort werden sie an antigenpräsentierende Zellen gebunden (2), die zum regionalen Lymphknoten wandern (3) und das Allergen den T-Helfer-Zellen präsentieren (4). Diese entwickeln sich zu Th2 und produzieren IL-4, -5 und -13 (5). Dies führt zur Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und zur Produktion von IgE-Antikörpern durch B-Lymphozyten. Die Quervernetzung von mastzellgebundenem IgE führt zur Degranulation von Mastzellen in der Haut (6). Durch die freigesetzten Entzündungsmediatoren werden Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen angeregt (7), die es weiteren Entzündungszellen ermöglichen, zu binden und in die Haut einzuwandern. In die Haut eingewanderte T-Lymphozyten setzen Zytokine frei und eosinophile Granulozyten degranulieren (8), was zu Entzündung und klinischen Symptomen führt (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).



**Abbildung 1: Pathogenese der atopischen Dermatitis (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).**

(Copyright 2009 Wiley. Abbildung aus: C. Loewenstein, R. S. Mueller, "A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine", Veterinary Dermatology, John Wiley and Sons, mit Genehmigung.)

## **1.2. Klinik**

Das klinisch hervorstechendste Merkmal der AD sowohl beim Menschen als auch beim Hund ist der Juckreiz (HANIFIN & RAJKA, 1980; GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010b).

Die AD des Menschen ist der des Hundes sehr ähnlich. Sie beginnt typischerweise in einem Alter unter zwei Jahren. Betroffene Körperbereiche sind die Kopfhaut, das Gesicht, der Nacken und die Flexorseiten der Extremitäten. Trockene Haut, Erytheme, Exkoriationen und Lichenifikationen sind die typischen Hautveränderungen (HANIFIN & RAJKA, 1980; WILLIAMS et al., 1994; THESTRUP-PEDERSEN, 2000; GRIFFIN & DEBOER, 2001).

Beim Hund beginnt die Erkrankung meist in einem Alter zwischen sechs Monaten und drei Jahren. Anfangs besteht oft nur Juckreiz ohne weitere Veränderungen. Es besteht im Moment noch Unklarheit, ob Primärläsionen im Verlauf der AD auftreten. Manche Autoren sehen Erythem als eine Primärläsion an, andere halten es eher für eine Sekundärläsion als Folge von Juckreiz oder Infektionen (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010b). Im Laufe der Zeit entstehen dann die typischen Sekundärveränderungen als Folge des Juckreizes durch Selbsttraumatisierung oder in Folge von Hautinfektionen. Dabei handelt es sich um Alopezie, Erosionen, Exkoriationen, Ulzerationen, Krusten, Papeln und Pusteln sowie Hyperpigmentierung und Lichenifizierung (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010b). Das Ausmaß der Symptome ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie Allergenexposition und damit auch von der Jahreszeit, Rasseprädisposition, Sekundärinfektionen und individuellen Faktoren (GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010b; OLIVRY et al., 2010a). Desweiteren bestehen zwischen verschiedenen Rassen Unterschiede in der Art und der Verteilung der Läsionen (JAEGER et al., 2010; WILHEM et al., 2011).

Prädilektionsstellen für die typischen Veränderungen der CAD sind das Gesicht und die Pinnae, die Pfoten und das Ventrum (GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010b; JAEGER et al., 2010). Häufig betroffen sind desweiteren der ventrale Hals, die Axillen, das Perineum und der ventrale Schwanz sowie die Flexorstellen und mediale Seite der Extremitäten (OLIVRY et al., 2010a). Es kann auch Otitis externa als zusätzliches, und in wenigen Fällen einziges,



Symptom bestehen (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). In einer retrospektiven Studie von JAEGER und Mitarbeitern (2010) litten rund 50 % der Hunde mit CAD an Otitis externa (JAEGER et al., 2010). Manche Hunde zeigen eine, teils saisonale, Konjunktivitis (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; GRIFFIN & DEBOER, 2001).

### **1.3. Diagnose**

Die Diagnose „atopische Dermatitis“ ist nicht leicht zu stellen. Weder in der Humanmedizin, noch in der Tiermedizin gibt es einen speziellen Test oder einen sogenannten „Goldstandard“. Dies liegt unter anderem an der komplexen und immer noch nicht vollständig bekannten Pathogenese, aber auch an dem überaus variablen Krankheitsbild. Kein klinisches Merkmal und kein immunologisches Kriterium ist pathognomonisch für die AD (DEBOER & HILLIER, 2001; OLIVRY, 2010). Um eine Diagnosestellung dennoch zu erleichtern und etwas zu vereinheitlichen, sind sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin Listen mit bestimmten Kriterien erstellt worden. Wenn eine bestimmte Anzahl der Kriterien erfüllt wird, ist die AD als eine der Hauptdifferentialdiagnosen anzusehen (HANIFIN & RAJKA, 1980; WILLEMSE, 1986; WILLIAMS et al., 1994; PRÉLAUD et al., 1998; OLIVRY, 2010). In einer 2010 veröffentlichten Studie von FAVROT und Mitarbeitern wurden die für die Veterinärmedizin erstellten Kriterienlisten von Willemse und Prélaud zum ersten Mal auf ihre Sensitivität und Spezifität überprüft. Die Werte betrugen 49,3 % und 80,2 % für die Kriterien nach Willemse und 74,3 % sowie 68,4 % für die Kriterien nach Prélaud. Desweiteren wurden zwei neue Kriterienlisten erstellt. Diese Listen weisen nicht nur eine höhere Sensitivität und Spezifität auf als die beiden bereits bekannten Listen, sie lassen sich darüber hinaus zusätzlich zur Diagnose der durch Umweltallergene ausgelösten allergischen Dermatitis auch zur Diagnose der durch Futtermittelallergene ausgelösten allergischen Dermatitis anwenden (FAVROT et al., 2010b) (siehe Anhang 3). Wie bereits erwähnt, lassen sich diese beiden Krankheiten klinisch nicht unterscheiden. Um einen futtermittelallergischen Hund von einem umweltallergischen Hund zu unterscheiden, muss momentan immer noch eine sogenannte Eliminationsdiät über sechs bis acht Wochen, mit anschließender Provokation, d.h. Fütterung des ursprünglichen Futters, das der Hund vor der Diät bekam, durchgeführt werden (ROSSER, 1993; GRIFFIN & DEBOER, 2001). Es konnten jedoch

vielversprechende Ergebnisse mit Patch-Tests zur Diagnose der Futtermittelallergie erzielt werden. Dieser könnte in Zukunft evtl. eine Alternative zu der relativ aufwendigen Eliminationsdiät darstellen (BETHLEHEM et al., 2012).

Leider sind auch die beiden neuen Kriterienlisten nach FAVROT und Mitarbeitern (2010) kein eindeutiges Diagnostikum. Mit einer Spezifität von ca. 80 % wird jeder fünfte Hund falsch diagnostiziert (FAVROT et al., 2010b). Daher ist es vonnöten, zusätzlich zur Anwendung dieser Kriterien sämtliche in Frage kommenden Differentialdiagnosen, wie z.B. Ektoparasiten, primär infektiöse Geschehen oder Keratinisierungsstörungen, auszuschließen. Erst nach Ausschluss sämtlicher nicht-allergischer Differentialdiagnosen und anschließendem Ausschluss allergischer Differentialdiagnosen, wie der Flohspeichelallergie mittels geeigneter Ektoparasitenkontrolle sowie der Futtermittelallergie mittels Eliminationsdiät, kann die Diagnose CAD sensu stricto gestellt werden (DEBOER & HILLIER, 2001; OLIVRY, 2010).

Ist die Diagnose gestellt, können mittels Intrakutantest oder Serum-Allergie-Test die verantwortlichen Allergene identifiziert werden und, ausgehend von den Ergebnissen, eine Desensibilisierung oder, falls möglich, eine Allergenvermeidung gestartet werden. Zu beachten ist dabei, dass auch die Ergebnisse dieser Tests nicht unfehlbar sind. Bei einem Serum-Allergie-Test wird antigenspezifisches IgE gemessen, welches jedoch auch manchmal bei gesunden, d.h. nicht-allergischen Hunden, vorhanden ist. Genauso verhält es sich bei dem Intrakutantest, bei dem die Mastzell-Degranulation nach Antigen-Exposition gemessen wird. Auch hier können gesunde Hunde positiv getestet werden. Daher sollten diese Tests der Bestimmung der verantwortlichen Allergene bei bereits diagnostizierten Umweltallergikern vorbehalten werden (CHAMBERS & GLASER, 1958; LINDBLAD & FARR, 1961; DREBORG, 1993; PASTORELLO, 1993; DEBOER & HILLIER, 2001; HILLIER & DEBOER, 2001).

#### **1.4. Therapie**

Mit Ausnahme der ASIT besteht die Therapie der atopischen Dermatitis momentan aus einer Kombination an symptomatischen Behandlungen (MUELLER, 2010; OLIVRY et al., 2010a).

### **1.4.1. Symptomatische Therapie**

Die wirksamsten symptomatischen Behandlungsmöglichkeiten sind systemisch verabreichte Immunsuppressiva wie Glukokortikoide und Calcineurin-Inhibitoren, gefolgt von lokal applizierten Glukokortikoiden und Calcineurin-Inhibitoren. Desweiteren können Antihistaminika, essentielle Fettsäuren und Shampoos einen positiven Effekt auf Hunde mit CAD haben (OLIVRY & MUELLER, 2003; OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2010b).

Leider treten bei den wirksamsten Medikamenten auch die schwerwiegendsten Nebenwirkungen auf, wohingegen weniger potente Medikamente zwar besser verträglich, jedoch in der Regel in ihrer Wirkung weniger zuverlässig sind, weshalb stets nach neuen Therapiemöglichkeiten geforscht wird (OLIVRY & MUELLER, 2003; OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2010b).

#### **1.4.1.1. Glukokortikoide**

Glukokortikoide können systemisch in Form von Spritzen oder Tabletten verabreicht, oder aber topisch in Form von Cremes oder Sprays auf die betroffene Haut aufgebracht werden (OLIVRY & SOUSA, 2001). Ihr Wirkungsmechanismus beruht darauf, dass sie die Transkription von Genen beeinflussen, indem sie die Expression unterdrücken oder stimulieren. Dies kann auf direktem Wege geschehen, indem sich der mit einem Glukokortikoid besetzte Glukokortikoid-Rezeptor an Promoterregionen von bestimmten Genen platziert, oder aber indirekt, indem er mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert (SCHULE et al., 1988; GRONEMEYER, 1992; TRUSS & BEATO, 1993; BEATO et al., 1995; BARNES, 1998). Dies führt unter anderem zu einer Hemmung der Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie IL-2, -3, -4, -5, -6 und -13, Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und Tumor Nekrose Faktor-alpha (PALIOGIANNI et al., 1993; MORI et al., 1997; BARNES, 1998), sowie zu einer Hemmung der Synthese proinflammatorischer Enzyme und der Rezeptoren für diese Zytokine und Enzyme (IHARA & NAKANISHI, 1990; ROBBINS et al., 1994; NEWTON et al., 1997; BARNES, 1998). Andererseits werden Gene mit antiinflammatorischer Wirkung hochreguliert, wodurch unter anderem vermehrt Lipocortin-1 gebildet wird, ein Inhibitor der Phospholipase A2. Dies führt zu einer verminderten Synthese vieler proinflammatorischer Arachidonsäurederivate, wie Prostaglandine und Thromboxane. Somit entsteht im Endeffekt die entzündungshemmende und

immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide (FLOWER & ROTHWELL, 1994; BARNES, 1998; OLIVRY & SOUSA, 2001).

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin gibt es verschiedene Protokolle zur Anwendung von Glukokortikoiden. So kann man akute Allergieschübe mit kurzfristiger, hochdosierter Glukokortikoidgabe in den Griff bekommen, oder versuchen, durch eine dauerhafte niedrig dosierte Glukokortikoidtherapie solche akuten Allergieschübe zu verhindern (DRAKE et al., 1992; OLIVRY & SOUSA, 2001; TOFTE & HANIFIN, 2001; OLIVRY et al., 2010a).

Warum Ärzte und Tierärzte trotz der hohen Wirksamkeit dieser Therapie oft von einer dauerhaften Glukokortikoidtherapie absehen, liegt an den vergleichsweise zahlreichen und z.T. schwerwiegenden Nebenwirkungen. Eine mögliche Folge der Glukokortikoidtherapie ist das Cushing-Syndrom, gekennzeichnet durch Polydipsie, Polyurie, Polyphagie, Muskelatrophie und Calcinosis cutis. Desweiteren kann es zu Leberschädigung und zur Begünstigung von Infektionen wie z.B. aufsteigenden Harnwegsinfektionen kommen. In seltenen Fällen können sogar potentiell lebensgefährliche Magenulzerationen oder Pankreatitiden durch eine langandauernde oder besonders hoch dosierte Therapie ausgelöst werden (OLIVRY & SOUSA, 2001; OLIVRY et al., 2010a).

Aus diesem Grund werden topische Produkte wie Salben und Sprays oft bevorzugt, da sie einfach und gezielt an betroffenen Stellen anzuwenden sind, somit nur eine geringe Dosis benötigt wird und ihre systemischen Nebenwirkungen vergleichsweise gering sind. Die lokalen Nebenwirkungen von Glukokortikoiden sollten jedoch nicht unterschätzt werden. Es kann auch hier zu Hautatrophie und sogar subepidermaler Vesikelbildung kommen (GROSS et al., 1997; KIMURA & DOI, 1999; OLIVRY & SOUSA, 2001).

Einen Sonderfall stellt ein 0,0584%iges Hydrocortison Aceponat-Spray dar, welches in der Tiermedizin zur Behandlung der CAD zugelassen ist, da es hauptsächlich lokal in der Haut wirkt und dort abgebaut wird. Über einen Zeitraum von 70 Tagen konnten keine Nebenwirkungen und auch keine Veränderungen der Blutwertparameter festgestellt werden (NUTTALL et al., 2009). BIZIKOVA und Mitarbeiter (2010) stellten allerdings eine milde Hautatrophie mit dieser Therapie fest (BIZIKOVA et al., 2010).

#### 1.4.1.2. Calcineurin-Inhibitoren

Cyclosporin A ist ein Metabolit der Pilzspezies *Tolypocladium inflatum* und wurde erstmals 1970 entdeckt. Es wird seit den 80er-Jahren in der Humanmedizin nach Organtransplantationen zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen eingesetzt (BOREL et al., 1976; CALNE et al., 1978; AMOR et al., 2010). Das zyklische Oligopeptid ist ein Calcineurin-Inhibitor und führt zu einer selektiven Suppression der T-Lymphozyten, indem es die Synthese bestimmter Zytokine wie z.B. IL-2 blockiert. IL-2 ist essentiell bei der Aktivierung von T-Lymphozyten (GIESE et al., 2004; FERRACCIOLI et al., 2005; AMOR et al., 2010). Andererseits kann es die Expression anderer Gene hochregulieren, sodass es z.B. zu einer vermehrten Produktion von Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) kommt (MASCARELL & TRUFFA-BACHI, 2003; GIESE et al., 2004; STEFFAN et al., 2006). Dies führt dazu, dass neben T-Lymphozyten auch antigenpräsentierende Langerhans-Zellen, Mastzellen und eosinophile Granulozyten blockiert werden, also die Zellen, die maßgeblich an allergischen Reaktionen beteiligt sind (DUPUY et al., 1991; TEUNISSEN et al., 1991; LAGENTE et al., 1994; SPERR et al., 1996; ORAN et al., 1997; MARSELLA & OLIVRY, 2001; STEFFAN et al., 2006).

Cyclosporin A wird mittlerweile sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin zur Behandlung der AD eingesetzt. Trotz seiner guten Wirksamkeit ist der Einsatz in der Humanmedizin aufgrund der z.T. massiven Nebenwirkungen eingeschränkt. Bei Langzeittherapie kommt es beim Menschen zu teils irreversiblen Nierenschäden und Bluthochdruck (BROWN et al., 1986; YOUNG et al., 1994; MROWIETZ et al., 1995; POWLES et al., 1998; RYAN et al., 2010). Desweiteren ist das Tumorrisiko erhöht (COCKBURN & KRUPP, 1989; RYAN et al., 2010). Weitere Nebenwirkungen sind Tremor und Anfälle, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall sowie Gingivahyperplasie (JOSS et al., 1982; THOMPSON et al., 1984; KRUPP & MONKA, 1990; BOKENKAMP et al., 1994; DOUFEXI et al., 2005; RYAN et al., 2010). Vor allem wegen der Nephrotoxizität wird Cyclosporin A in der Humanmedizin nur kurzzeitig zur Kontrolle akuter Allergieschübe oder intermittierend eingesetzt (CAMP et al., 1993; RYAN et al., 2010).

In der Tiermedizin wurden bislang bei normaler Dosierung keine nephrotoxischen Nebenwirkungen beobachtet (FONTAINE & OLIVRY, 2001; OLIVRY et al.,

2002a; OLIVRY et al., 2002b; STEFFAN et al., 2003). Am häufigsten treten gastrointestinale Nebenwirkungen wie Anorexie, Erbrechen und Durchfall auf. In seltenen Fällen kann es zu Gingivahyperplasie oder kutaner Papillomatose kommen. Alle diese Nebenwirkungen sind nach Absetzen des Medikamentes reversibel (RYFFEL et al., 1983; FONTAINE & OLIVRY, 2001; MARSELLA & OLIVRY, 2001; OLIVRY et al., 2002a; OLIVRY et al., 2002b; STEFFAN et al., 2003). Um eine Aussage über ein evtl. erhöhtes Krebsrisiko nach Langzeittherapie zu treffen, liegen in der Tiermedizin noch nicht genügend Daten vor. Aufgrund dieser vergleichsweise guten Verträglichkeit und der sehr guten Wirksamkeit, die mit der von Glukokortikoiden vergleichbar ist (MARSELLA & OLIVRY, 2001; STEFFAN et al., 2003), wird Cyclosporin A in der Tiermedizin auch zur symptomatischen Langzeittherapie eingesetzt. Die ersten zwei bis vier Wochen kann zusätzlich mit Glukokortikoiden therapiert werden, da Cyclosporin A seine volle Wirkung erst nach vier bis sechs Wochen entfaltet (OLIVRY et al., 2010a). Bei vielen Tieren kann die Dosis des Medikamentes nach ein bis zwei Monaten reduziert werden, indem man entweder täglich die halbe Dosis verabreicht, oder aber jeden zweiten Tag die volle Dosis (STEFFAN et al., 2003; OLIVRY et al., 2010a).

Ein weiterer Calcineurin-Inhibitor ist Tacrolimus. Dieser Metabolit des Pilzes *Streptomyces tsukubaensis* unterscheidet sich chemisch zwar von Cyclosporin A, hat aber denselben Wirkungsmechanismus (KINO et al., 1987b; KINO et al., 1987a; MARSELLA & OLIVRY, 2001). Tacrolimus wird topisch in Form von Cremes appliziert. In der Humanmedizin wird es bereits erfolgreich zur Behandlung der AD eingesetzt. Da es kaum resorbiert wird, entfallen die Nebenwirkungen, die den Langzeiteinsatz von Cyclosporin A verhindern. Die einzigen aufgetretenen Nebenwirkungen waren Hautirritationen, ein Brennen auf der Haut und Juckreiz (BOGUNIEWICZ et al., 1998; REITAMO et al., 2000; HULTSCH et al., 2005; MCCOLLUM et al., 2010). Daher wird Tacrolimus als Alternative zu Glukokortikoid-haltigen Salben angesehen. Die Wirkung tritt jedoch nicht so schnell ein wie bei Glukokortikoid-haltigen Salben, weshalb Tacrolimus evtl. eher als Erhaltungstherapie geeignet ist, sobald akute Schübe mit Hilfe von Glukokortikoiden unter Kontrolle sind (MCCOLLUM et al., 2010).

Auch zur Behandlung der CAD ist Tacrolimus geeignet, vor allem lokalisierte Läsionen können damit behandelt werden. Da der klinische Effekt bei Hunden

noch später eintritt als bei Menschen, eignet sich Tacrolimus auch hier nicht zur Behandlung akuter Schübe der CAD, sondern eher zur Behandlung chronischer Läsionen. Dazu sollte mit einem zweimal täglichen Behandlungsintervall begonnen werden, das dann nach und nach reduziert wird. Auch bei Hunden wurden keine systemischen Nebenwirkungen beobachtet, die einzigen Nebenwirkungen, die bisher auftraten, waren initiale Hautirritationen (MARSELLA & NICKLIN, 2002; BENSIGNOR & OLIVRY, 2005; OLIVRY et al., 2010a).

#### **1.4.1.3. Antihistaminika**

Antihistaminika blockieren die Wirkung von Histaminen, indem sie Histaminrezeptoren besetzen (DEBOER & GRIFFIN, 2001). Histamine werden z.B. bei der Mastzelldegranulation freigesetzt und tragen zur allergischen Entzündungsreaktion der Haut bei (DEBOER & GRIFFIN, 2001; AMIN, 2012). Man unterscheidet vier verschiedene Histaminrezeptoren, die an unterschiedlichen Lokalisationen exprimiert werden (LEURS et al., 2011; SIMONS & SIMONS, 2011). Histamin-(H)1-Rezeptoren sind z.B. in Blutgefäßen, der glatten Muskulatur der Lunge und des Gastrointestinaltraktes, im Herzen und im zentralen Nervensystem lokalisiert. Ihre Aktivierung verursacht Juckreiz, Schmerz und vermehrte Durchlässigkeit der Blutgefäße. H2-Rezeptoren befinden sich in der Mukosa des Magens, im Uterus, im Herzen und im zentralen Nervensystem und vermitteln unter anderem eine erhöhte Magensäuresekretion sowie eine vermehrte Durchlässigkeit der Gefäße (DEBOER & GRIFFIN, 2001; SIMONS & SIMONS, 2011). Bei der Behandlung der atopischen Dermatitis spielen momentan nur H1-Rezeptor-Antagonisten eine Rolle. H4-Rezeptor-Antagonisten könnten zukünftig relevant werden, befinden sich jedoch momentan noch in der Versuchsphase (DEBOER & GRIFFIN, 2001; ROSSBACH et al., 2009; LEURS et al., 2011; SIMONS & SIMONS, 2011). Man unterscheidet H1-Rezeptor-Antagonisten der ersten Generation, die neben dem antipruritischen Effekt einen sedierenden Effekt haben, und H1-Rezeptor-Antagonisten der zweiten Generation ohne oder nur mit geringem sedierenden Effekt (OLIVRY & MUELLER, 2003; SIMONS & SIMONS, 2011). Manche Antihistaminika haben neben der Histaminrezeptorblockade noch andere Effekte, wie die Verhinderung der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen und Basophilen (LIPPERT et al., 1995) oder die verringerte Expression von Adhäsionsmolekülen

(CIPRANDI et al., 1996). Erst seit relativ kurzer Zeit ist bekannt, dass H1-Rezeptor Antagonisten tatsächlich gar keine wahren Antagonisten sind, sondern reverse Agonisten, die die inaktive Form des Histaminrezeptors stabilisieren (BAKKER et al., 2000; SIMONS & SIMONS, 2011).

Bei der humanen AD haben manche Antihistaminika bei einigen Menschen einen juckreizreduzierenden Effekt, während sie bei anderen weniger gut oder gar nicht wirken (HOARE et al., 2000; DEBOER & GRIFFIN, 2001). Unklar ist, wie groß die Bedeutung der sedierenden Wirkung der H1-Rezeptor-Antagonisten der ersten Generation in Bezug auf die Reduktion des Juckreizes ist (DEBOER & GRIFFIN, 2001). Eine 2000 veröffentlichte Meta-Analyse kontrollierter Studien zur Therapie der humanen AD ergab, dass die vorliegenden Studien nicht ausreichen, um eine Behandlung mit Antihistaminika zu empfehlen oder davon abzuraten (HOARE et al., 2000).

Leider fehlen bislang auch bei der CAD schlüssige Beweise in Form von randomisierten, kontrollierten Studien, um eine Therapie mit Antihistaminika zu befürworten oder abzulehnen – mit zwei Ausnahmen (OLIVRY & MUELLER, 2003; OLIVRY et al., 2010a). Cetirizin, ein H1-Rezeptor-Antagonist der zweiten Generation, verhinderte die allergen- und histamininduzierte Bildung von Quaddeln (DE VOS et al., 1987), hatte einen suppressiven Effekt auf die Ausbildung von Quaddeln beim Intrakutantest (TEMIZEL et al., 2011), und zeigte einen reproduzierbaren, juckreizstillenden Effekt in einer einfach-verblindeten, placebokontrollierten Studie (COOK et al., 2004). Histacalmine<sup>®</sup> (Virbac, Carros, Frankreich), ein Kombinationspräparat in dem sowohl Hydroxyzin als auch Chlorpheniramin enthalten sind, zeigte eine zufriedenstellende Verbesserung des klinischen Bildes bei 24 % der an einer randomisierten, kontrollierten, doppelt-verblindeten Studie teilnehmenden Hunde (EWERT & DAEMS, 2001), sodass laut der „International Task Force on Canine Atopic Dermatitis“ ausreichende Beweise für eine Empfehlung der Behandlung der CAD mit diesem Kombinationspräparat vorliegen (OLIVRY & MUELLER, 2003). Bei allen anderen Antihistaminika konnte keine zufriedenstellende Verbesserung festgestellt werden oder der therapeutische Effekt war in weiteren Studien nicht reproduzierbar (OLIVRY & MUELLER, 2003; OLIVRY et al., 2010a).

Nebenwirkungen sind bei Hunden selten und meist geringfügig. So zeigen



praktisch alle H1-Rezeptor-Antagonisten der ersten Generation eine sedierende Wirkung, die jedoch in Bezug auf die Juckreizhemmung auch eine therapeutische Rolle spielen kann (OLIVRY & MUELLER, 2003). Zusätzlich können gastrointestinale Nebenwirkungen wie z.B. Erbrechen auftreten (COOK et al., 2004).

Abschließend ist zu sagen, dass trotz der wenigen Beweise ein Therapieversuch mit verschiedenen Antihistaminika von erfahrenen Veterinärdermatologen empfohlen wird (DEBOER & GRIFFIN, 2001). Dies liegt zum einen daran, dass Antihistaminika, auch wenn sie selber nur eine geringe juckreizlindernde Wirkung zeigen, evtl. einen Glukokortikoid-sparenden Effekt haben können (DEBOER & GRIFFIN, 2001; MUELLER, 2010) und zum anderen daran, dass Antihistaminika in Remissionsphasen einen proaktiven Effekt haben könnten und erneute Allergieschübe verhindern oder abmildern könnten. Hierfür liegen jedoch derzeit noch keine wissenschaftlichen Daten vor (MUELLER, 2010). Manchmal kann auch die Kombination mit essentiellen Fettsäuren eine Wirkungssteigerung bewirken (PATERSON, 1995; DEBOER & GRIFFIN, 2001).

#### **1.4.1.4. Essentielle Fettsäuren**

Für essentielle Fettsäuren werden zwei verschiedene mögliche Wirkungsmechanismen postuliert. Zum einen greifen bestimmte mehrfach ungesättigte essentielle Fettsäuren in die Arachidonsäurekaskade ein, indem sie anstelle von Arachidonsäure verstoffwechselt werden, wodurch antiinflammatorische Prostaglandine und Leukotriene anstelle von proinflammatorischen Prostaglandinen und Leukotrienen gebildet werden. Zusätzlich wird die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor und IL-2 gehemmt und somit auch die T-Zell-Aktivierung blockiert (BJORNEBOE et al., 1987; MILLER et al., 1988; MEYDANI et al., 1991; BYRNE et al., 2000; ZIBOH et al., 2000; OLIVRY et al., 2001a).

Der zweite Wirkungsmechanismus betrifft die Hautbarriere. Wie bereits erwähnt, wurde in verschiedenen Studien herausgefunden, dass sowohl bei Menschen als auch bei Hunden mit AD wichtige Bestandteile der natürlichen Hautbarriere, die zum Teil aus essentiellen Fettsäuren bzw. deren Derivaten aufgebaut ist, in verminderter Quantität vorhanden sind, insbesondere manche Ceramide und Sphingosine. Dies führt zu einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust und

einer erhöhten Infektionsanfälligkeit (IMOKAWA et al., 1991; ARIKAWA et al., 2002; REITER et al., 2009; SHIMADA et al., 2009). Durch Gabe solcher mehrfach ungesättigter essentieller Fettsäuren, entweder oral oder topisch auf die Haut, verspricht man sich, die Hautbarriere wieder zu verbessern und somit den erhöhten transepidermalen Wasserverlust wie auch die Infektionsanfälligkeit zu verringern (MARSH et al., 2000; OLIVRY et al., 2001a).

Sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin gibt es zahlreiche Studien, die einen positiven Effekt essentieller Fettsäuren auf die atopische Dermatitis erkennen lassen (BJORNEBOE et al., 1987; WATANABE & KURODA, 1999; MARSH et al., 2000; OLIVRY et al., 2001a; TRETTER & MUELLER, 2011). Leider fehlen in der Tiermedizin noch ausreichend kontrollierte, randomisierte, geblindete Studien von ausreichender Dauer (OLIVRY et al., 2001a). Bei vielen bisher durchgeführten Studien, in denen essentielle-Fettsäuren-Präparate getestet wurden, wurde z.B. nicht die Diät der Tiere vorgeschrieben, wodurch schon allein durch das Futter sehr große Unterschiede in der Aufnahme essentieller Fettsäuren zwischen den einzelnen Hunden bestanden. Oft sind die Studien auch von zu kurzer Dauer, da es Monate dauern kann, bis der Effekt der essentiellen Fettsäuren eintritt (OLIVRY et al., 2001a).

Essentielle Fettsäuren können evtl. wie Antihistaminika einen Glukokortikoid-sparenden Effekt haben, daher wird ihre Gabe vor allem bei chronisch allergischen Hunden, die dauerhaft mit Glukokortikoiden behandelt werden, unterstützend empfohlen (SAEVIK et al., 2004; MUELLER, 2010).

#### **1.4.1.5. Shampootherapie**

Shampoonieren wird bei Hunden mit CAD oft als unterstützende oder in sehr milden Fällen einzige Therapie empfohlen. Durch eine Shampootherapie können bei der CAD zwei unterschiedliche Ziele verfolgt werden. Zum einen kann die Verwendung eines milden, nicht-irritierenden Shampoos mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen – wie z.B. essentiellen Fettsäuren, Mono- und Polysacchariden, kolloidalem Hafermehl und Vitaminen – der Hydrierung der Haut dienen, den Juckreiz lindern und mechanisch Allergene sowie Mikroorganismen von der Haut entfernen. Zum anderen können Shampoos mit antibakteriellen und/oder antimykotischen Wirkstoffen wie z.B. Chlorhexidin oder Miconazol unterstützend zur Therapie von Hautinfektionen eingesetzt werden (CURTIS, 1998;

MUELLER, 2002, 2010). Die Wirksamkeit antipruritischer Shampoos wurde erst in wenigen randomisierten, placebokontrollierten Studien untersucht, wobei nur in einer Studie eine signifikante Verbesserung des Juckreizes nachzuweisen war. Auffällig war dabei, dass auch schon der rein mechanische Vorgang des Waschens in einem Whirlpool ohne Shampoo einen juckreizlindernden Effekt hatte (LOFLATH et al., 2007; OLIVRY et al., 2010a). In einer anderen kontrollierten Studie, in der ein Shampoo, das antibakterielle Wirkstoffe enthielt (Phytosphingosine und Chlorhexidin), mit einem Shampoovehikel ohne antibakterielle Wirkstoffe verglichen wurde, konnte kein Unterschied in der antimikrobiellen Wirksamkeit festgestellt werden. Die Keimzahl konnte mit beiden Shampoos reduziert werden, was dafür spricht, dass schon allein der mechanische Vorgang des Waschens unterstützend bei der Therapie von bakteriellen Hautinfektionen wirken kann (STROH et al., 2010). Da die topische Therapie mit Shampoos – abgesehen von möglichen Hautirritationen – praktisch keine Nebenwirkungen aufweist und durch die unterstützende Verwendung evtl. die systemische Verabreichung von Medikamenten reduziert werden kann, ist ihre Anwendung als unterstützende Therapie sinnvoll (CURTIS, 1998; MUELLER, 2002, 2010).

#### **1.4.2. ASIT**

Die ASIT ist momentan die einzige ursächliche Behandlungsmöglichkeit der AD. Dabei werden den betroffenen Individuen die Allergene, die für die Erkrankung verantwortlich sind, in aufsteigender Dosierung verabreicht (OLIVRY et al., 2001b). Die Wirkung beruht darauf, dass durch die hohe Allergenexposition eine massive Antigenpräsentation z.B. durch Langerhans Zellen stattfindet. Dies führt zu einer starken T-Zell-Aktivierung, welche wiederum zu einer vermehrten IFN- $\gamma$  Produktion und einer erhöhten Produktion von IgG4, IgG1 und IgA sowie einer verminderten IgE-Produktion führt, also zu einer Verschiebung von der Th2-Immunantwort zu einer Th1-Immunantwort. Zusätzlich werden Regulationsmechanismen aktiviert. Beim Menschen und beim Hund wurde gezeigt, dass eine erfolgreiche Desensibilisierung mit einer Erhöhung von Regulations-T-Zellen und von diesen Zellen sezerniertem IL-10 und TGF- $\beta$  einhergeht, welche wiederum überschießende Entzündungsreaktionen unterdrücken und maßgeblich zur Verschiebung der IgE-lastigen zu einer IgG-lastigen Antikörperbildung beitragen (JUTEL et al., 1995; AKDIS et al., 1998;

JUTEL et al., 2003; AKDIS et al., 2004; SHIDA et al., 2004; LARCHE et al., 2006; HOU et al., 2008; KEPPEL et al., 2008; MEILER et al., 2008; AKKOC et al., 2011).

Die Wirksamkeit der ASIT ist beim Menschen bei der allergischen Rhinitis, Konjunktivitis und Asthma sowie Insektenstich-Überempfindlichkeiten und AD nachgewiesen (NOON, 1911; BOUSQUET et al., 1987; BOUSQUET et al., 1990; WYSS et al., 1993; GRUBER et al., 1999; ROSS et al., 2000b, 2000a; ABRAMSON et al., 2003; WERFEL et al., 2006; JACOBSEN et al., 2007; CARBALLADA et al., 2010). Auch bei Hunden zeigen Studien die Wirksamkeit der ASIT bei AD (PARK et al., 2000; COLOMBO et al., 2005; SCHNABL et al., 2006). Randomisierte, kontrollierte Doppelblindstudien sind zwar noch selten (WILLEMSE et al., 1984; MUELLER et al., 2004b; COLOMBO et al., 2005), jedoch zeigen eine Reihe von offenen, nicht kontrollierten Studien und Erfahrungsberichte etablierter Veterinärdermatologen, dass eine positive Wirkung durchaus auch bei Hunden zu beobachten ist (GRIFFIN & HILLIER, 2001). Leider wirkt die ASIT nur bei ca. 60 - 80 % der betroffenen Hunde, die Angaben variieren je nach Studie, wobei sich nur ca. 20 % der Hunde klinisch soweit verbessern, dass sie ohne unterstützende, symptomatische Therapie oder allein mit topischer Therapie wie z.B. Shampootherapie auskommen. Die restlichen 40 - 60 % der Hunde verbessern sich zwar klinisch, brauchen aber zusätzlich noch andere systemische Therapeutika (NUTTALL et al., 1998; SCHNABL et al., 2006; COLOMBO et al., 2007). Es kann bis zu einem Jahr dauern, bis die Wirkung eintritt (WILLEMSE et al., 1984; NUTTALL et al., 1998).

Die ASIT hat nur wenige bekannte Nebenwirkungen, wie stärkeren Juckreiz nach Allergeninjektion, Urtikaria und Angioödem, anaphylaktoide Reaktionen und selten anaphylaktischer Schock (NUTTALL et al., 1998; MUELLER & BETTENAY, 2001; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

## **2. Interferon**

1957 untersuchten ISAACS und LINDENMANN den Einfluss von hitze-inaktiviertem Influenza-Virus auf das Wachstum eines nicht-inaktivierten Influenza-Virus an der Chorioallantois-Membran von zehn Tage alten Küken und entdeckten dabei einen anderen Faktor, der das Wachstum des Lebendvirus beeinflusste: das Interferon (IFN), ein Protein (ISAACS & LINDENMANN,

1957; ISAACS et al., 1957).

Im Laufe der Jahre wurde immer mehr über IFN bekannt, wie z.B., dass es sich nicht nur um ein Protein handelt (HAVELL et al., 1975), sondern um eine Familie von Proteinen. Man unterscheidet mittlerweile zwischen Typ I, Typ II und Typ III IFN mit mehreren Subtypen (HOBBS & PESTKA, 1982; FLORES et al., 1991; HARDY et al., 2004; BORDEN et al., 2007).

Beim Menschen besteht die Familie der Typ I IFN aus 17 verschiedenen IFN. Es gibt 13 verschiedene Moleküle von  $\alpha$ -IFN und jeweils ein IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\epsilon$  und IFN- $\kappa$ . Bei unterschiedlichen Säugetierspezies kann die Anzahl der Typ I IFN variieren, so besitzen Mäuse kein IFN- $\omega$ , dafür hat das Schwein als einzige Spezies ein IFN- $\delta$  und Wiederkäuer als einzige ein IFN- $\tau$  (FLORES et al., 1991; HARDY et al., 2004; PESTKA et al., 2004; BORDEN et al., 2007).

Die Familie der Typ II IFN besteht nur aus IFN- $\gamma$ . Seine Aminosäuresequenz weist nur eine entfernte Homologie mit der der Typ I IFN auf, es ist glykosyliert, im Gegensatz zu den meisten Typ I IFN, und es wirkt über einen anderen Rezeptor (PESTKA et al., 2004; BORDEN et al., 2007).

Zur Familie der Typ III IFN gehören drei Subtypen von IFN- $\lambda$  (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003; BORDEN et al., 2007; UZE & MONNERON, 2007).

### **2.1. Induktion und Wirkungsweise der Interferone**

IFN werden nicht konstant in gleichem Maße produziert und freigesetzt, vielmehr wird die IFN-Produktion und -Freisetzung induziert. In dem Versuch von ISAACS und LINDENMANN (1957) wird die IFN-Produktion durch inaktivierte und lebendige Viren induziert. Mittlerweile weiß man, dass nicht nur Viren, sondern auch Bakterien, Protozoen sowie einzelne Bestandteile und Produkte eben genannter Organismen wie z.B. DNA oder RNA, Proteine und Peptide, Fette etc. die IFN-Produktion induzieren (ISAACS & LINDENMANN, 1957; FIELD et al., 1967; AKIRA et al., 2006; BORDEN et al., 2007).

Diese Substanzen binden an Toll-like-Rezeptoren (TLR) an der Zellmembran oder auch im endoplasmatischen Retikulum, bzw. an zytoplasmatische RNA-Helikasen. Über eine Signalkaskade werden anschließend Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche an entsprechende Promotorregionen binden und somit IFN Gene

aktivieren (AKIRA et al., 2006; HONDA et al., 2006; BORDEN et al., 2007; PANNE et al., 2007). Prinzipiell kann so gut wie jede Zelle nach viraler Infektion IFN produzieren. Dies gilt v.a. für Typ I IFN. Typ II IFN wird nur von Immunzellen wie natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und T-Helfer-Zellen gebildet (BACH et al., 1997; BORDEN et al., 2007; TRINCHIERI, 2010; KILADJIAN et al., 2011).

Als natürlich vorkommende Zytokine (IFN und ihre Rezeptoren gehören zu einer Untergruppe der Klasse 2  $\alpha$ -helikalen Zytokine (KRAUSE & PESTKA, 2005; PESTKA, 2007)) wirken IFN nach ihrer Freisetzung autokrin und parakrin auf intra- und interzelluläre Vorgänge (BORDEN et al., 2007). Dafür binden sie an Transmembran-Rezeptoren. Alle Typ I IFN binden an denselben Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten besteht: IFN- $\alpha$ -Rezeptor 1 (IFNAR1) und IFN- $\alpha$ -Rezeptor 2 (IFNAR2). IFNAR2 besitzt eine 1000-fach größere Affinität für Typ I IFN als IFNAR1. Er ist wahrscheinlich v.a. für die Ligandenbindung, aber auch für die Signalübertragung verantwortlich. Es existieren mehrere Isoformen dieses Rezeptors, der lösliche IFNAR2a, die kurze Transmembranform IFNAR2b und die lange Transmembranform IFNAR2c. Die meisten Typ I IFN werden aufgrund der vielfach höheren Affinität zuerst an IFNAR2 binden und anschließend an IFNAR1, aber auch die umgekehrte Variante ist nachgewiesen. Man geht davon aus, dass die unterschiedlichen Affinitäten und die Bindungsreihenfolge für die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der verschiedenen Typ I IFN verantwortlich ist (GAVUTIS et al., 2006; JAITIN et al., 2006; BORDEN et al., 2007; JAKS et al., 2007; UZE et al., 2007; KILADJIAN et al., 2011). Typ II IFN binden ebenfalls an einen Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten besteht, IFN- $\gamma$ -Rezeptor 1 (IFNGR1) und IFN- $\gamma$ -Rezeptor 2 (IFNGR2). Der Komplex, der gebildet wird, wenn IFN- $\gamma$  an den Rezeptor bindet, sieht etwas anders aus als der Komplex, der von den Typ I IFN mit ihrem Rezeptor gebildet wird, da zwei IFN- $\gamma$  an jeweils zwei IFNGR1 und IFNGR2 binden (WALTER et al., 1995; BACH et al., 1997; BORDEN et al., 2007). Typ III IFN haben wieder ihren eigenen Rezeptor, der ebenfalls aus zwei Untereinheiten besteht, durch diesen werden jedoch dieselben Signalfade aktiviert wie durch Typ I IFN (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003; BORDEN et al., 2007; UZE & MONNERON, 2007).

Nachdem das jeweilige IFN an seinen Transmembran-Rezeptor gebunden hat,

werden über verschiedene Kinasen, v.a. Januskinasen (JAK) aber auch Tyrosinkinasen (TYK), sogenannte STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) aktiviert, die entweder selbst oder durch Aktivierung bzw. mit Hilfe anderer Transkriptionsfaktoren und IFN regulierender Faktoren (IRF) die Transkription von Interferon-stimulierten-Genen (ISG) fördern oder hemmen. Einige dieser Signaltransduktionswege hat man schon vollständig entschlüsselt, während andere nur zum Teil bekannt sind (FU et al., 1992; VELAZQUEZ et al., 1992; STARK et al., 1998; BORDEN et al., 2007; SCHINDLER et al., 2007). Auf diesem Weg entfalten IFN ihre zahlreichen Wirkungen.

IFN spielen eine wichtige Rolle sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem. Vereinfacht lässt sich sagen, dass IFN eine antivirale, antiproliferative/antitumorale, eine antiangiogenetische und eine immunmodulatorische Wirkung haben. Diese Wirkungen werden durch zahlreiche unterschiedliche Mechanismen erreicht. Für die antivirale Wirkung sind zahlreiche Proteine und Enzyme verantwortlich, die über ISG gebildet werden und die Replikation von Viren behindern bzw. in ihre Proteinsynthese eingreifen. Auch wirken viele ISG proapoptotisch, d.h. sie fördern den programmierten Zelltod, was sowohl einer antiviralen, als auch einer antitumoralen Wirkung gleichkommt. Es gibt jedoch auch ISG, die antiapoptotisch wirken, was die Vielfältigkeit der IFN-induzierten Wirkungen unterstreicht (KERR & BROWN, 1978; ZHOU et al., 1993; CASTELLI et al., 1998; KAYAGAKI et al., 1999; TAHARA et al., 2005; BORDEN et al., 2007; SILVERMAN, 2007). IFN haben auch antiproliferative/antitumorale Wirkung, indem sie die Expression tumor-assoziiierter-Antigene und die Expression von "major histocompatibility complex" (MHC)-Antigenen, somit also die Antigenpräsentation steigern. Dadurch wird dem Organismus, d.h. dem Immunsystem, die Erkennung und Beseitigung von Tumoren und Krankheitserregern erleichtert (CHEN et al., 2000; RIZZA et al., 2010; KILADJIAN et al., 2011). Es werden vermehrt vaskuläre Adhäsionsmoleküle und Chemokine exprimiert, wodurch mehr Leukozyten an Infektionsherden akkumulieren können (COLE et al., 1998; BORDEN et al., 2007). Ferner wird die Aktivität der T-Lymphozyten, der Makrophagen und der NK-Zellen gesteigert (KILADJIAN et al., 2011). Die Immunmodulation erfolgt unter anderem durch Modulation der Antikörperproduktion, Inhibition der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ und die Steigerung der

Zytotoxizität der T- und NK-Zellen (PENE et al., 1988; VON HOEGEN et al., 1990; FINKELMAN et al., 1991; VON HOEGEN, 1995; BELARDELLI & GRESSER, 1996; OKADA, 2005). Der antiangiogenetische Effekt kommt dadurch zustande, dass die Genexpression spezieller Wachstumsfaktoren ("basic fibroblast growth factor" und "vascular endothelial cell growth factor") gehemmt wird. Außerdem werden angiostatische Chemokine vermehrt exprimiert (SINGH et al., 1995; VON MARSCHALL et al., 2003; INDRACCOLO et al., 2007; INDRACCOLO, 2010). Die antiproliferative Wirkung der IFN hat auch eine Unterdrückung der Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen zur Folge, welche direkt oder auch indirekt über die Unterdrückung der Bildung bestimmter hämatopoetischer Wachstumsfaktoren erfolgen kann (AMAN et al., 1994; LU et al., 2010; KILADJIAN et al., 2011). Diese Wirkung kann beim therapeutischen Einsatz von IFN zur Bekämpfung bestimmter Tumoren (Leukämie) erwünscht sein, aber auch zu dosislimitierenden Nebenwirkungen (Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie) bei der Therapie anderer Erkrankungen führen.

## **2.2. Orale Verabreichung von Interferon**

IFN werden gewöhnlich in hoher Dosierung parenteral verabreicht. Auf diesen Wegen gelangt IFN direkt oder indirekt in den Blutkreislauf und kann somit im gesamten Organismus seine Wirkung entfalten. Die Verabreichung hoher Dosen führt zu den besten Ergebnissen, die Dosis wird jedoch durch das Auftreten von Nebenwirkungen limitiert.

Ein alternativer Weg der Verabreichung ist die orale Verabreichung. Die Wirkungsweise der IFN nach oraler Verabreichung unterscheidet sich von der anderer Verabreichungsmethoden, da IFN im Magen-Darm-Trakt Verdauungsprozessen unterliegen. In zahlreichen Studien an verschiedenen Tiermodellen konnte nach oraler Verabreichung von IFN kein IFN im Vollblut oder Serum nachgewiesen werden (CANTELL & PYHALA, 1973; WILLS et al., 1984; GIBSON et al., 1985; EID et al., 1999). Dennoch zeigt oral verabreichtes IFN in verschiedenen Studien antivirale, antitumorale und immunmodulierende Eigenschaften (BEILHARZ et al., 1997; EID et al., 1999; GILGER et al., 1999; SATOH et al., 1999; TOVEY & MAURY, 1999). Nach intragastraler Verabreichung von ovinem IFN- $\tau$  bei Mäusen, konnte im Blutkreislauf eine signifikante Erhöhung des durch IFN induzierten Enzyms 2'5'-Oligoadenylat-Synthetase nachgewiesen werden (NAKAJIMA & SOKAWA, 2002). Ein



ebensolcher Anstieg des Enzyms in Vollblut nach oraler IFN-Verabreichung konnte bei Meerschweinchen nachgewiesen werden (SATO et al., 1999).

Einer der postulierten Wirkungsmechanismen von oral verabreichtem IFN ist, dass IFN mit lymphatischem und epitheliale Gewebe im oronasalen Bereich und im Verdauungstrakt interagiert und dort lokal wirkt. Dieser lokale Effekt könnte der Anstoß für eine systemische, immunmodulierende Wirkung sein (BEILHARZ et al., 1997; CUMMINS et al., 1999; TOMPKINS, 1999; CUMMINS et al., 2005). In einer Studie mit Mäusen reicherte sich IFN nach oraler Verabreichung vor allem in Geweben an, die sich in der Nähe von lymphatischem Gewebe befanden, im Bereich der hinteren Nasenhöhle, am Zungengrund, im Dünndarm und Rektum (BEILHARZ et al., 1997). In einer anderen *in vivo* Studie am Mausmodell konnte nach oraler Verabreichung von rekombinantem humanem IFN zwar keine Expression IFN-responsiver Gene in mononukleären Zellen des peripheren Blutes oder in Lymphozyten der Milz nachgewiesen werden, jedoch wurde die Transkription IFN-responsiver Gene lokal in lymphatischem Gewebe des Oropharynx nachgewiesen (EID et al., 1999).

Interessanterweise wirkt IFN nach oraler Verabreichung umso besser, je niedriger die Dosis ist. Höhere Dosen zeigen dagegen keinen, oder sogar einen inhibitorischen Effekt (MOORE et al., 1996; BEILHARZ et al., 1997; SATO et al., 1999; TOMPKINS, 1999). Dies entspricht der physiologischen Wirkungsweise des IFN bei dem sogenannten "Priming". Zellen, die mit niedrigen IFN-Konzentrationen vorbehandelt wurden, waren anschließend, z.B. nach Provokation durch ein Virus, in der Lage, umso mehr IFN zu produzieren. Wurden die Zellen dagegen mit hohen Dosen IFN vorbehandelt, so war ihre Fähigkeit auf einen Stimulus hin IFN zu produzieren eingeschränkt. Evtl. hängt dieser Mechanismus mit den IFN-Rezeptoren zusammen, die nach Stimulation mit geringen Mengen IFN vermehrt exprimiert werden, nach Stimulation mit hohen Mengen IFN jedoch herunterreguliert werden (ISAACS et al., 1958; LOCKART, 1963; TOMPKINS, 1999).

In keiner der oben aufgeführten Studien traten Nebenwirkungen nach oraler IFN-Verabreichung auf. Auch eine Antikörperbildung gegen spezie fremdes Protein wurde nicht beschrieben.

### 2.3. Interferone in der Humanmedizin

In der Humanmedizin wird IFN vor allem gegen virale Erkrankungen, Tumorerkrankungen und multiple Sklerose (MS) eingesetzt. Auch bei atopischer Dermatitis kommt IFN zum Einsatz.

Haupteinsatzgebiet von IFN in Bezug auf virale Erkrankungen ist die chronische Hepatitis B und C (FRIED et al., 2002; LAU et al., 2005; BORDEN et al., 2007; CHEN & YU, 2010; KILADJIAN et al., 2011). Die Therapie wird mit Typ I IFN, hauptsächlich IFN- $\alpha$  durchgeführt. Im Laufe der Zeit und mit Hilfe zahlreicher Studien fand man heraus, dass die besten Ergebnisse mit Hilfe einer Kombinationstherapie mit Ribavirin erzielt werden können. Ebenso erhält man bessere Resultate, wenn man statt des ursprünglichen IFN pegyliertes IFN (PegIFN) verwendet. Hierbei wird ein inertes Polyethylenglycolpolymer an das IFN angehängt. Dadurch wird das IFN-Molekül größer und erhält eine längere Halbwertszeit bei reduzierter Clearance, aber gleichzeitig erhaltener biologischer Aktivität. Dieses PegIFN muss nur einmal wöchentlich verabreicht werden, ebenfalls in Kombination mit Ribavirin (MANNS et al., 2001; FRIED et al., 2002; HEATHCOTE & MAIN, 2005; CHEN & YU, 2010). Auch bei humanem Herpesvirus (WINSTON et al., 1988) und humanem Papillomavirus (PAZIN et al., 1982) wurde IFN schon erfolgreich eingesetzt. Aufgrund der Entwicklung neuerer antiviraler Medikamente mit teils besserer Wirksamkeit bei geringeren Nebenwirkungen (z.B. Acyclovir) wird IFN bei Herpesviruserkrankungen aber praktisch nicht mehr verwendet (BORDEN et al., 2007).

Desweiteren wird IFN, wie bereits erwähnt, zur Tumor-Therapie eingesetzt. Dies ist sogar die erste Indikation, für die IFN klinisch zugelassen wurde (BORDEN et al., 2007). IFN wird bei chronischer B-Zell Leukämie (Haarzelleukämie) (GOLOMB et al., 1986), bei chronischen myeloischen Leukämien (CML) (BONIFAZI et al., 2001; PREUDHOMME et al., 2010), aber auch bei systemischer Mastzellerkrankung (KLUIN-NELEMANS et al., 1992; LIM et al., 2009), hypereosinophilem Syndrom (BUTTERFIELD & GLEICH, 1994; CERETELLI et al., 1998) und Philadelphia chromosom-negativen myeloproliferativen Neoplasien (MPN) wie Polyzythämia vera (PV) und essentieller Thrombozythämie (ET) (KILADJIAN et al., 2008; QUINTAS-CARDAMA et al., 2009) erfolgreich eingesetzt (KILADJIAN et al., 2011). Ebenso ist IFN bei Lymphomen, Melanomen, Nierenzell- und Blasenkarzinomen

zumindest teilweise wirksam (ROHATINER et al., 2005; BORDEN et al., 2007; SHINOHARA et al., 2009; SHINOHARA et al., 2012; TARHINI et al., 2012). Sein Einsatz hat sich jedoch in den letzten Jahren stark reduziert und ist oft nicht mehr die erste Wahl seit Medikamente entwickelt wurden, die gezielter wirken und dabei weniger Nebenwirkungen aufweisen, wie Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) oder Inhibitoren anderer Kinasen, wie z.B. Imatinib (BORDEN et al., 2007; KILADJIAN et al., 2011). Es ist jedoch möglich, dass IFN in der Tumorthherapie wieder an Bedeutung gewinnt, da die gezielt wirkenden Kinaseinhibitoren nicht bei allen Patienten wirken, sich teilweise Resistenzen gebildet haben und die Langzeitremission nicht befriedigend ist. IFN, mit seiner vielseitigen Wirkungsweise, kann der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum auf mehreren Wegen entgegenwirken und damit eventuell öfter zu Remissionen führen, die länger anhalten können. Daher gibt es jetzt Studien zu eventuellen Kombinationstherapien mit Kinaseinhibitoren und IFN bzw. zur Langzeittherapie mit IFN bei Patienten in Remission um Rückfälle zu verhindern (BURCHERT et al., 2010; PREUDHOMME et al., 2010; KILADJIAN et al., 2011).

IFN- $\beta$  wird als Therapie der Wahl bei schubförmig remittierender multipler Sklerose (RRMS) eingesetzt (BERMEL & RUDICK, 2007; BORDEN et al., 2007; RUDICK & GOELZ, 2011). Ursprünglich entschied man sich für eine Therapie mit IFN, da man zum einen eine virale Genese der MS vermutete, zum anderen zeigten Zellkulturen von MS-Patienten eine geringere IFN-Aktivität nach viraler Induktion (JACOBS et al., 1981; BERMEL & RUDICK, 2007; BORDEN et al., 2007). IFN- $\alpha$  rief zu viele Nebenwirkungen hervor und IFN- $\gamma$  zeigte nur eine unbefriedigende Wirksamkeit (KNOBLER et al., 1984; PANITCH et al., 1987). Studien mit IFN- $\beta$  zeigten, dass die Krankheit durch diese Therapie in ihrem Fortschreiten verzögert werden konnte. Krankheitsschübe konnten um ca. 30 % reduziert werden und es traten bei behandelten Patienten weniger neue, im MRT darstellbare, Läsionen auf. Da die Wirkungen des IFN nach Verabreichung so komplex sind – nicht nur die direkte Wirkung durch über 1000 ISG ist zu berücksichtigen, sondern auch indirekte Wirkungen durch Beeinflussung der Zellen des Immunsystems oder durch die Bildung von Transkriptionsfaktoren, die zur Stimulation weiterer Gene führen – ist es bisher nicht gelungen, den Mechanismus zu bestimmen, mit dem IFN das Voranschreiten der MS verhindert (JACOBS et al., 1981; DUQUETTE et al., 1995; BORDEN et al., 2007; RUDICK

& GOELZ, 2011).

#### **2.4. Interferone in der Kleintiermedizin**

Auch in der Tiermedizin kommt IFN bereits zum Einsatz. RFeIFN- $\omega$  ist bei Katzen zugelassen bei nicht terminalen Stadien sowohl von feline Immundefizienzvirus (FIV) Erkrankungen als auch von feline Leukämievirus (FeLV) Erkrankungen. Bei Hunden ist es zur Behandlung der Parvovirose, einer Durchfallerkrankung die v.a. Welpen betrifft, zugelassen. In zahlreichen Studien wurde IFN bei den verschiedensten Erkrankungen experimentell eingesetzt.

Der Einsatz von rFeIFN- $\omega$  bei Katzen, die entweder nur mit FeLV oder gleichzeitig mit FeLV und FIV infiziert waren, zeigte eine längere Lebensdauer bei gleichzeitig verringerten klinischen Symptomen (DE MARI et al., 2004). Schon vor der Entwicklung von rFeIFN wurde der therapeutische Effekt von IFN bei FeLV-Infektionen untersucht. ZEIDNER und Mitarbeiter therapierten 1990 schon Katzen mit FeLV-Infektionen mit humanem IFN- $\alpha$ 2b (HuIFN- $\alpha$ 2b) oder AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine triphosphate) bzw. einer Kombination. HuIFN- $\alpha$ 2b, mit oder ohne AZT, reduzierte die im Blut zirkulierende Antigenmenge signifikant. Der therapeutische Effekt wurde jedoch dosisabhängig nach drei bis sieben Wochen durch die Bildung neutralisierender Antikörper gegen HuIFN- $\alpha$ 2b stark eingeschränkt bzw. komplett unterbunden (ZEIDNER et al., 1990).

Bei Hunden konnte eine Verbesserung der klinischen Symptomatik und eventuell eine erhöhte Überlebenschance nach rFeIFN- $\omega$ -Behandlung bei Infektionen mit dem caninen Parvovirus in mehreren Studien, darunter auch placebokontrollierte Doppelblindstudien (MARTIN et al., 2002; DE MARI et al., 2003), nachgewiesen werden (ISHIWATA et al., 1998; MINAGAWA et al., 1999).

Ein positiver therapeutischer Effekt von IFN konnte bei weiteren Viruserkrankungen festgestellt werden. So konnte IFN schon mehrfach erfolgreich zur Behandlung von feline Caliciviren eingesetzt werden (OHE et al., 2008), unter anderem auch bei einem Fall von therapieresistenter chronischer feline Gingivastomatitis mit Calicivirus-Beteiligung (SOUTHERDEN & GORREL, 2007). Auch bei feline Herpesvirus (FHV)-Erkrankungen zeigte IFN Wirkung (GUTZWILLER et al., 2007). Der experimentelle Einsatz von IFN bei feline infektiöser Peritonitis (FIP) zeigte vielversprechende Resultate, wenn die

Therapie zum Zeitpunkt einer experimentellen Infektion gestartet wurde (WEISS et al., 1990). Der Einsatz von rFeIFN- $\omega$  bei Katzen mit FIP zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose zeigte keine statistisch relevante Besserung im Vergleich zu einem Placebo (RITZ et al., 2007).

Die orale Verabreichung von HuIFN- $\alpha$  bei Hunden mit immunmediierter Keratokonjunktivitis sicca zeigte eine Verbesserung des klinischen Bildes und einen höheren Schirmer-Tränen-Test Wert bei 55 % der teilnehmenden Hunde (GILGER et al., 1999).

Auch bei tumorösen Erkrankungen konnten in der Tiermedizin in Studien experimentell *in vitro* und *in vivo* gute Effekte mit IFN erzielt werden (CAVE et al., 2004; PENZO et al., 2009). Leider lässt sich oft aufgrund einer Vielzahl an Begleittherapien nicht genau sagen, ob IFN allein für einen Therapieerfolg verantwortlich war, oder eine Kombination von verschiedenen Medikamenten mit IFN (CAVE et al., 2004). Die Wirksamkeit von rFeIFN- $\omega$  bei feline Fibrosarkom muss noch in weiteren Studien belegt werden (HAMPEL et al., 2007).

## **2.5. Interferontherapie der atopischen Dermatitis**

### **2.5.1. Humanmedizin**

B-Lymphozyten, die mit IL-4 inkubiert wurden, produzierten in Anwesenheit von T-Lymphozyten und Monozyten vermehrt IgE. Diese vermehrte IgE-Produktion konnte dosisabhängig durch IFN- $\gamma$ , aber auch durch IFN- $\alpha$ , komplett gehemmt werden (PENE et al., 1988). In einer *in vitro* Studie von REINHOLD und Mitarbeitern (1990) wurde gezeigt, dass mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von Menschen mit AD nach Stimulation sehr viel weniger IFN- $\gamma$  bildeten als PBMC von gesunden Menschen. Diese Suppression war unabhängig von der IL-2-Konzentration oder der An- bzw. Abwesenheit von Monozyten (REINHOLD et al., 1990). Desweiteren zeigte eine Studie von RENZ und Mitarbeitern (1992) dass PBMC von Patienten mit AD eine sehr viel höhere Expression von mRNA des IL-4-Rezeptors und auch eine sehr viel höhere IL-4-Produktion aufwiesen. Beides wurde durch IFN- $\gamma$  gehemmt (RENZ et al., 1992).

Wie bei der Pathogenese der AD bereits beschrieben, scheint es also so, als wäre das gestörte IL-4/IFN- $\gamma$ -Verhältnis bei Patienten mit AD verantwortlich für die

überschießende IgE-Produktion. Da IgE in der Pathogenese der AD von großer Bedeutung ist, wurden diese Erkenntnisse als Anstoß genommen, IFN als Therapeutika in der AD in Betracht zu ziehen (HANIFIN et al., 1993).

IFN- $\gamma$  wurde bereits in zahlreichen Studien zur Behandlung der AD erfolgreich eingesetzt (HANIFIN et al., 1993; STEVENS et al., 1998; JANG et al., 2000). Die Dosis und das Verabreichungsintervall variieren zwischen den einzelnen Studien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine höhere Dosis zu besseren und schnelleren Erfolgen führt, die Höhe der Dosis wird allerdings durch die Nebenwirkungen und die Kosten begrenzt. Es kam zu klinisch signifikanten Verbesserungen fast aller atopischen Symptome, nach Absetzen des IFN kam es jedoch leider zu rapiden Rückfällen. Ein Overshoot-Phänomen konnte nicht beobachtet werden. Interessanterweise wurde die IgE-Konzentration in keiner der Studien reduziert. Stattdessen sank die Zahl der Eosinophilen (HANIFIN et al., 1993; STEVENS et al., 1998) bzw. der aktivierten Eosinophilen und der aktivierten T-Zellen (JANG et al., 2000), ein Umstand, der die Autoren zu der Mutmaßung veranlasste, dass IFN- $\gamma$  die Proliferation und Aktivität der Th2 blockiert.

Bei einem dreijährigen Kind mit diagnostizierter AD, Asthma und allergischer Rhinitis, bei dem IgE nur mittelgradig erhöht war, wurde IFN- $\gamma$  getestet. Überraschenderweise war die IFN- $\gamma$ -Konzentration normal bzw. sogar ggr. erhöht. Im Gegensatz dazu war IFN- $\alpha$  so niedrig, dass es unter der Nachweisgrenze lag (DOLEN & MATHUR, 1995). Die Autoren dieses Case Reports sahen dies als Grund, die bisher vernachlässigte Forschung des therapeutischen Einsatzes von IFN- $\alpha$  bei AD weiter voran zu treiben.

Verschiedene Studien beschäftigen sich mit dem Einsatz von IFN- $\alpha$  bei AD mit unterschiedlichen Ergebnissen. In einer offenen, nicht kontrollierten Studie zeigte IFN- $\alpha$  bei zwei erwachsenen Patienten mit AD keinerlei klinischen Effekt (MACKIE, 1990). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von sechs Kindern mit AD zu vollständiger Remission und einem Abfall der stark erhöhten IgE-Konzentration in den Normalbereich (KIMATA et al., 1995). Im Unterschied zu der Studie von MACKIE (1990), wurden bei KIMATA und Mitarbeitern (1995) Kinder behandelt, keine Erwachsenen, das Verabreichungsintervall von IFN- $\alpha$  war einmal täglich im Gegensatz zu jeden dritten Tag und, der wohl größte Unterschied, die bei KIMATA und Mitarbeitern (1995) behandelten Kinder litten

alle zusätzlich an Krankheiten, die mit IFN- $\alpha$  behandelt wurden, wie CML, chronischer Hepatitis B und chronischer Hepatitis C. Infolge dessen ist es unklar, ob die höhere Dosis und/oder das Alter für diese unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sind, oder ob die zusätzlichen, schweren Erkrankungen einen Einfluss auf den Verlauf der AD hatten und mit deren Remission auch die AD in Remission ging (KIMATA et al., 1995). Interessant ist aber der Abfall des IgE bis in den Normalbereich, besonders, da dieser Effekt mit IFN- $\gamma$  nicht erzielt wurde. In einer weiteren Studie zeigte IFN- $\alpha$ 2a Erfolg bei einer bestimmten Untergruppe von Patienten mit AD, nämlich bei Patienten mit einem bestimmten klinischen Erscheinungsbild der AD, dem sogenannten Besnier's Prurigo Muster, die nicht auf IFN- $\gamma$  und Thymopentin angesprochen hatten und deren IgE und Eosinophile im Blut nicht erhöht waren (NOH & LEE, 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IFN- $\alpha$  als Therapie bei humaner AD zu klinischer Verbesserung führen kann, die genauen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend ungeklärt und daher ist es auch unbekannt, warum die Resultate der verschiedenen Studien mit IFN- $\alpha$  bei AD so unterschiedlich sind. Mögliche Gründe für die unterschiedliche Effektivität können das Alter der Patienten, die Dosis und das Intervall der Verabreichung des IFN, die Art von IFN- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b, natürliches IFN- $\alpha$ ) und die unterschiedlichen Arten von AD sein (KIMATA et al., 1995; NOH & LEE, 2001).

Ein möglicher Wirkungsmechanismus der IFN- $\alpha$ -Therapie könnte sein, dass IFN- $\alpha$  als Typ I IFN als Induktor der IFN- $\gamma$ -Produktion fungiert, welches wiederum die Th1-Immunantwort induziert. Folglich wird die Imbalance im Immunsystem bei Patienten mit AD, bei der die Th2-Antwort gegenüber der Th1-Antwort überwiegt, korrigiert und auch das IL-4/IFN- $\gamma$ -Verhältnis ausgeglichen (ROGGE et al., 1997; TOMPKINS, 1999).

### **2.5.2. Tiermedizin**

IWASAKI (2004) nahm die humanmedizinischen Studien mit IFN- $\gamma$  und die auch bei Hunden vermutete Th1/Th2-Imbalance als Grundlage für eine Pilotstudie, in der er die Wirkung von rCaIFN- $\gamma$  bei zehn Hunden mit AD testeten. Nach zwei Wochen zeigten sieben von zehn Hunden eine klinische Verbesserung und bei sechs von diesen Hunden war der IL4/IFN- $\gamma$ -mRNA-Quotient gesunken. Bei neun der zehn Hunde war das totale Serum IgE gesunken. Hautbiopsien zeigten eine

verringerte Anzahl der Mastzellen nach IFN- $\gamma$  Verabreichung. All diese Resultate befürworten einen positiven therapeutischen Effekt von rCaIFN- $\gamma$  bei Hunden mit AD (IWASAKI, 2004).

Aufgrund dieses positiven Ergebnisses führten IWASAKI und HASEGAWA (2006) eine Folgestudie durch. Diese Multizenter-Studie war randomisiert und kontrolliert, rCaIFN- $\gamma$  wurde mit einem topisch applizierten Antihistaminikum (Diphenhydramin) verglichen. Bei den teilnehmenden 92 Hunden wurden über vier Wochen 10.000 internationale Einheiten (I.E.) rCaIFN- $\gamma$  pro kg Körpergewicht (KGW) dreimal wöchentlich s.c. verabreicht, während Diphenhydramin zweimal täglich aufgetragen wurde. Die mit rCaIFN- $\gamma$  behandelten Hunde zeigten eine deutliche klinische Verbesserung, die Effektivitätsrate lag bei den Symptomen Pruritus, Exkoration, Erythem und Alopezie bei ca. 70 % im Vergleich zu nur je ca. 20 % bei den Hunden, die mit Diphenhydramin behandelt wurden. Ein Hund zeigte Schmerzen bei jeder Injektion, dies war jedoch die einzige Nebenwirkung, die mit rCaIFN- $\gamma$  in Verbindung gebracht werden konnte (IWASAKI & HASEGAWA, 2006).

In einer placebokontrollierten Doppelblindstudie von HASEGAWA und Mitarbeitern (2004) wurden Hunde dreimal wöchentlich mit 10.000 I.E. rCaIFN- $\gamma$  pro kg KGW über zwei Wochen behandelt. Das Ergebnis der Studie war, dass rCaIFN- $\gamma$  für die Behandlung der CAD sicher und effektiv ist. Nur ein Hund zeigte Nebenwirkungen in Form von weicherem Kot (HASEGAWA et al., 2004).

Um herauszufinden, welches die niedrigste effektive Dosis von rCaIFN- $\gamma$  zur Behandlung der CAD ist, verglichen YASUKAWA und Mitarbeiter (2010) zwei verschiedene Dosen miteinander. Die in Japan zugelassene Dosierung zur Behandlung der CAD ist 10.000 I.E. pro kg KGW. In der Studie von YASUKAWA und Mitarbeitern (2010) bekam eine Gruppe von Hunden 2000 I.E./kg KGW und die andere Gruppe bekam 5000 I.E./kg KGW über einen Zeitraum von acht Wochen, in den ersten vier Wochen dreimal wöchentlich, danach einmal wöchentlich. Die Wirkung des IFN war dosisabhängig, d.h., je höher die Dosis, desto besser die Wirkung. Die Behandlung mit 5000 I.E./kg KGW war jedoch von der Effektivität annähernd vergleichbar zur Behandlung mit 10.000 I.E./kg KGW. Erbrechen, Durchfall, Inappetenz und Aktivitätsverlust wurden als bekannte Nebenwirkungen erwähnt, bei YASUKAWA und Mitarbeitern (2010) zeigte nur ein Hund Durchfall, jedoch verbunden mit



Schwellungen im Gesichtsbereich, was als anaphylaktische Reaktion gewertet wurde. Der Hund wurde mit Prednisolon erfolgreich behandelt (YASUKAWA et al., 2010).

In einer doppelt-verblindeten, kontrollierten Studie wurde rFeIFN- $\omega$  mit Cyclosporin als Therapeutikum der CAD verglichen. Dafür wurden die Hunde entsprechend ihrem Gewicht in verschiedene Gruppen eingeteilt und mit einer für die einzelnen Gruppen festgelegten Dosis von rFeIFN- $\omega$  oder Cyclosporin über einen Zeitraum von sechs Monaten behandelt. Begleitende Therapie war für beide Gruppen vereinheitlicht und beschränkt. Bis zu Tag 90 waren kurzzeitige Interventionsbehandlungen mit Prednisolon 1 mg/kg KGW für beide Gruppen erlaubt. Die Studie ergab, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab. Beide zeigten signifikante Verbesserungen des Juckreizes und der Läsionen. Somit war die Wirksamkeit von rFeIFN- $\omega$  in dieser Studie vergleichbar mit der von Cyclosporin, einem schon etablierten und sehr gut wirksamen Medikament zur Behandlung der CAD. Die einzige Nebenwirkung, die mit rFeIFN- $\omega$  in Zusammenhang gebracht wurde, war verstärkter Juckreiz über drei Tage nach jeder Injektion bei einem Hund (CARLOTTI et al., 2009). Ob die Hunde während des Studienverlaufs Antikörper gegen das feline IFN bildeten wurde nicht untersucht.

## **2.6. Nebenwirkungen der Interferontherapie**

### **2.6.1. Humanmedizin**

Die häufigsten Nebenwirkungen, die IFN in der Humanmedizin auslösen, und auch bei der Behandlung der AD ausgelöst haben, sind Erkältungssymptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen und Schüttelfrost (HANIFIN et al., 1993; STEVENS et al., 1998; JANG et al., 2000; DEUTER et al., 2009). Diese Symptome legen sich meist im Verlauf der Behandlung von selbst wieder. Vorbeugend wird häufig empfohlen, vor der Applikation von IFN ein nichtsteroidales Antiphlogistikum einzunehmen. Zusätzlich kann es teilweise zu Müdigkeit, Anorexie, Übelkeit und Erbrechen kommen, sowie zu Depressionen und eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten. Je höher die Dosis des verabreichten IFN ist, desto wahrscheinlicher und gravierender ist das Auftreten von Nebenwirkungen (KIRKWOOD et al., 1996; KIRKWOOD et al., 2000; KIRKWOOD et al., 2002; GUILLAUME-CZITROM et al., 2007; PLSKOVA et

al., 2007).

Sehr häufig kommt es auch zu Blutbildveränderungen wie Leukopenie, insbesondere Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie. Diese Veränderungen sind auf die antiproliferative Wirkung von IFN zurückzuführen. Sie sind dosisabhängig und dosislimitierend, verschwinden aber nach Absetzen von IFN auch wieder (KIRKWOOD et al., 1996; KIRKWOOD et al., 2000; KIRKWOOD et al., 2002).

In der Serumchemie kann man oft eine Erhöhung der Leberwerte, v.a. der AST, feststellen. Auch die Triglyceride können erhöht sein. Bei sehr hohen IFN-Dosierungen und unzureichender Dosisanpassung kam es sogar zu Todesfällen aufgrund der Lebertoxizität von IFN (KIRKWOOD et al., 1996; KIRKWOOD et al., 2000; KIRKWOOD et al., 2002).

In sehr seltenen Fällen kann es zu gravierenden Nebenwirkungen kommen, wie z.B. Grand-Mal-Anfällen oder auch autoimmunen Reaktionen, wie Antikörperbildung gegen körpereigene DNA oder antithyreoidale Antikörper, sowie Antikörperbildung gegen körpereigenes IFN (OBERG et al., 1989; CONLON et al., 1990; DEUTER et al., 2009; AHMED et al., 2011; STUBIGER et al., 2011).

### **2.6.2. Tiermedizin**

In der Tiermedizin sind bislang weniger Nebenwirkungen der IFN-Therapie bekannt als in der Humanmedizin. Ob dies an der kürzeren Lebensdauer der Tiere liegt, oder daran, dass IFN in der Tiermedizin noch nicht so lange zum Einsatz kommt und daher noch nicht viele Nebenwirkungen erforscht sind, oder ob IFN von den Tieren einfach besser vertragen wird, bleibt noch zu klären.

FelV und FelV-/ FIV-ko-infizierte Katzen, die mit rFeIFN- $\omega$  behandelt wurden zeigten Lethargie, Erbrechen und Durchfall. Diese Symptome konnten jedoch nicht mit IFN in Verbindung gebracht werden, da kein signifikanter Unterschied zur Placebo-Gruppe bestand (DE MARI et al., 2004).

Erbrechen, Durchfall, Inappetenz und Aktivitätsverlust werden in der bereits erwähnten Studie von YASUKAWA und Mitarbeitern (2010) als bekannte Nebenwirkungen von rCaIFN- $\gamma$  angegeben (YASUKAWA et al., 2010).

In den Studien, die sich mit der IFN-Therapie der CAD beschäftigen, traten als

Nebenwirkungen nur Schmerzen an der Injektionsstelle, vermehrter Juckreiz nach Injektion, Durchfall sowie eine anaphylaktische Reaktion bei jeweils einem Hund auf (HASEGAWA et al., 2004; IWASAKI, 2004; IWASAKI & HASEGAWA, 2006; CARLOTTI et al., 2009; YASUKAWA et al., 2010).

### **2.7. Interferontherapie und Antikörperbildung**

Im Verlauf der Behandlung mit IFN kann es beim Menschen zur Bildung neutralisierender Antikörper gegen dieses IFN kommen. Dies kann dazu führen, dass die Therapie unwirksam wird und der Patient einen Rückfall, bzw. keine weitere Verbesserung der Symptomatik erleidet (VON WUSSOW et al., 1987; OBERG et al., 1989). In einer Studie von ITRI und Mitarbeitern (1987) wurde festgestellt, dass 25 % der mit IFN behandelten Patienten neutralisierende Antikörper bilden, wobei die Wahrscheinlichkeit einer Antikörperbildung mit längerer Therapiedauer zunimmt. In dieser Studie hatte die Bildung neutralisierender Antikörper jedoch nicht immer einen negativen Einfluss auf den Therapieerfolg (ITRI et al., 1987). Die Bildung neutralisierender Antikörper gegen therapeutisch verabreichtes IFN ist nicht zu verwechseln mit der Bildung von Autoantikörpern gegen körpereigene Strukturen wie antinukleäre Antikörper (ANA) oder antithyreoidale Antikörper oder auch Antikörper gegen körpereigenes IFN, die, wie bereits erwähnt, eine gravierende, aber seltene Nebenwirkung der Interferontherapie darstellt, aber nicht mit der Bildung von neutralisierenden anti-IFN-Antikörpern einhergehen muss (OBERG et al., 1989; CONLON et al., 1990; DEUTER et al., 2009).

Da felines bzw. canines rekombinantes IFN erst seit relativ kurzer Zeit verfügbar ist, wurden Studien und Versuchstherapien früher mit dem bereits verfügbaren rekombinanten humanen IFN (rHuIFN) durchgeführt. Katzen wurden mit subkutan appliziertem rHuIFN- $\alpha$  gegen FeLV behandelt. Die Behandlung schlug zunächst an, nach drei bis sieben Wochen ließ die Wirkung aber nach. Bei der Untersuchung dieses Phänomens stellte sich heraus, dass die Katzen gegen dieses Fremdprotein neutralisierende Antikörper gebildet hatten (ZEIDNER et al., 1990). Interessanterweise war die Zeit bis zur Bildung neutralisierender Antikörper und auch der Antikörpertiter dosisabhängig. Je höher die verabreichte IFN-Dosis, desto schneller wurden Antikörper gebildet und desto höher war auch der Titer. Auch in anderen Studien wurde die Bildung neutralisierender Antikörper gegen humanes IFN in Katzen nach s.c. Applikation festgestellt (CAVE et al., 2004).

Wie bereits erwähnt, wurde nach oraler IFN Verabreichung, auch von speziesfremdem IFN, nicht von einer Antikörperbildung berichtet (GILGER et al., 1999; SATOH et al., 1999; NAKAJIMA & SOKAWA, 2002; HARTMANN, 2005).

Ob Hunde nach (Langzeit-)Therapie mit rFeIFN- $\omega$  Antikörper bilden, wurde noch nicht untersucht. Ebenso wurde in keiner der erwähnten Studien untersucht, ob es bei Tieren, genauso wie bei Menschen, auch zu einer Antikörperbildung gegen körpereigene Strukturen oder körpereigenes IFN kommt.

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Studiendesign**

Die Studie war als randomisierte, offene Feldstudie angelegt. Hunde, die an AD litten, wurden mit Hilfe einer Randomisierungstafel auf zwei Gruppen aufgeteilt. Beide Gruppen wurden über vier Monate mit rFeIFN- $\omega$  (Virbagen<sup>®</sup> omega, Virbac, Carros, Frankreich) behandelt. Die erste Gruppe wurde subkutan behandelt, die zweite Gruppe oral.

Ziel der Studie war es, herauszufinden, ob Hunde Antikörper gegen subkutan oder oral verabreichtes rFeIFN- $\omega$  entwickeln. Als Nebenziel wurde zusätzlich die klinische Entwicklung der Patienten dokumentiert und ausgewertet.

Besitzer mussten vor Studienbeginn eine schriftliche Einverständniserklärung unterschreiben, die alle relevanten Details der Studie enthielt (siehe Anhang 4). Die Studie wurde vor Beginn von der Tierversuchskommission genehmigt (Gz. 55.2-1-45-2531-119-10).

#### **2. Patienten**

Die Diagnose AD wurde anhand der Patientenhistorie/Anamnese und der klinischen Untersuchung gestellt. Nicht-allergische Differentialdiagnosen wurden mittels geeigneter Tests, wie z.B. Flohkontrolle, Hautgeschabsel oder Versuchstherapie gegen oberflächliche Milben ausgeschlossen. Falls indiziert, wurden weitere Proben und Tests veranlasst, um evtl. vorhandene andere Erkrankungen wie Dermatophytose oder hormonelle Erkrankungen auszuschließen. Hautinfektionen durch Bakterien oder Hefepilze wurden basierend auf der Klinik bzw. anhand der zytologischen Auswertung von Abklatschpräparaten diagnostiziert und falls nötig entsprechend behandelt, galten aber nicht als Ausschlusskriterien, da sie das Hauptziel der Studie nicht beeinträchtigten. Aus demselben Grund war es nicht obligatorisch für Patienten, vor Studienbeginn eine Eliminationsdiät zum Ausschluss einer futtermittelinduzierten AD zu durchlaufen. Eine bereits begonnene Eliminationsdiät konnte fortgeführt werden. Systemisch verabreichte Glukokortikoide und systemisch verabreichtes Cyclosporin mussten spätestens zwei Wochen vor Studienbeginn abgesetzt werden. Es war den Besitzern nicht

erlaubt, ihre Hunde während der Dauer der Studie impfen zu lassen. Alle Hunde befanden sich in Privatbesitz und waren Patienten der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

### **3. Zusätzliche Therapeutika**

Zusätzliche Therapeutika und falls nötig Therapieänderungen waren während der Dauer der Studie erlaubt, wurden jedoch mit Hilfe eines sogenannten "Medication Scores" dokumentiert. Patienten, die systemisch mit Glukokortikoiden oder Cyclosporin behandelt wurden, mussten diese Medikamente mindestens zwei Wochen vor Studienbeginn absetzen. Während der Studie war die systemische Verabreichung dieser beiden Medikamente untersagt. Die topische Applikation von Medikamenten derselben Wirkstoffgruppen war erlaubt, da dadurch eine Antikörperbildung nicht beeinträchtigt werden sollte. Das traf auf topische Behandlungen mit cortisonhaltigen Präparaten wie cortisonhaltige Salben (z.B. Fuciderm<sup>®</sup>, Bayer), Cortisonsprays (z.B. Cortavance<sup>®</sup>, Virbac) und cortisonhaltige Ohrentropfen zu.

### **4. Ausschlusskriterien**

Hunde mit diagnostiziertem Morbus Cushing waren von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen, da der krankheitsbedingt erhöhte Blutcortisolspiegel eine Antikörperbildung unterdrücken könnte.

### **5. Intervention**

Von jedem Studienpatienten wurde vor Beginn (Tag 0) und am Ende (Tag 120) der Studie eine venöse Blutprobe gewonnen. Hunde in Gruppe 1 erhielten rFeIFN- $\omega$  als subkutane Injektionen an den Tagen 0, 3, 7, 14, 21, 35, 56 und 90, während Hunde in Gruppe 2 das Medikament täglich oral erhielten. Die Dosierung erfolgte anhand von vier Gewichtsgruppen und wurde für Gruppe 1 von der Studie von CARLOTTI und Mitarbeitern (2009) übernommen (CARLOTTI et al., 2009). Bei Gruppe 2 erfolgte die Dosierung anhand derselben Gewichtsgruppen, wobei von einer Dosierung von ca. 50 internationalen Einheiten (I.E.) pro kg KGW ausgegangen wurde, da damit in anderen Studien (GILGER et al., 1999; HARTMANN, 2005) bereits gute Ergebnisse erzielt wurden (siehe Tabelle 1). Gruppe 1 erhielt Virbagen<sup>®</sup> omega unverdünnt, für die

orale Verabreichung wurde Virbagen® omega (10 Millionen I.E./ml) 1:2000 mit handelsüblicher physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) für Infusionszwecke (Ecoflac® plus 250 ml, B.Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt. Nachdem das als Lyophilisat vorliegende Medikament rekonstituiert bzw. für die orale Verabreichung entsprechend verdünnt wurde, wurde es für maximal drei Wochen bei 4°C aufbewahrt und im Anschluss entsorgt. Laut dem Hersteller Virbac (telefonischer Kontakt mit Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland) wurde die Stabilität des Medikamentes nach Rekonstitution und auch nach Verdünnung mit 0,9 % NaCl für ca. drei bis vier Wochen bei Kühlschranktemperaturen in unveröffentlichten Studien bestätigt.

**Tabelle 1: Dosierung von rFeIFN- $\omega$**

Körpergewicht	Orale Gabe	Subkutane Gabe
< 15 kg	500 I.E.	1 Million I.E.
15-29 kg	1000 I.E.	2 Millionen I.E.
30-44 kg	1500 I.E.	3 Millionen I.E.
> 44 kg	2000 I.E.	4 Millionen I.E.

Virbagen® omega enthält 10 Millionen I.E. pro ml. Daher ergibt sich, je nach Gewicht, für die subkutane Verabreichung eine Menge von 0,1 - 0,4 ml pro Tier. Die 1/2000 Verdünnung von Virbagen® omega enthält 5000 I.E. pro ml, woraus sich, je nach Gewicht, für die orale Verabreichung ebenfalls eine Menge von 0,1 - 0,4 ml pro Tier ergibt.

## **6. Klinische Untersuchungen, Dokumentation**

Eine ausführliche klinische Untersuchung fand zu Beginn der Studie (Tag 0), nach zwei Monaten (Tag 90) und nach vier Monaten (Tag 120) statt. Zu diesen Zeitpunkten wurde auch jeweils ein sogenannter "Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index", kurz "CADESI", durch einen Tierarzt angefertigt. Hierbei handelt es sich um einen extra für klinische Studien entwickelten validierten Läsionenscore, anhand dessen das Hautbild eines Hundes beurteilt

wird. Dabei werden vier verschiedene Kriterien (Erythem, Lichenifikation, Alopezie, Erosion) an 62 verschiedenen Körperregionen jeweils mit einem Wert von 0 bis 5 bewertet. Dadurch lässt sich eine objektive und reproduzierbare Aussage über das Hautbild des Patienten, bzw. eine Verbesserung oder Verschlechterung desselben treffen (OLIVRY et al., 2007b; OLIVRY et al., 2008) (siehe Anhang 5).

Desweiteren wurde von den Besitzern ausgefüllt:

1) eine validierte Juckreizskala (an Tag 0, Tag 90 und Tag 120): auf dieser wurde der Juckreiz der Hunde von den Besitzern anhand einer visuellen Analogskala von 0 bis 10 eingeschätzt (RYBNICEK et al., 2009) (siehe Anhang 6).

2) ein Medication Score (an Tag 0, Tag 90 und Tag 120): hierauf mussten die Besitzer angeben, welche Medikamente ihre Hunde in den letzten zwei Wochen bekamen und in welcher Dosierung. Wenn die Tiere keine zusätzlichen Medikamente erhielten, so wurde dies mit 0 Punkten gewertet. Falls nur topische Therapie z.B. Shampoo verabreicht wurde, wurde dies mit 5 Punkten gewertet. Antihistaminika und/oder Supplementierung mit essentiellen Fettsäuren wurde mit je 10 Punkten gewertet. Die topische Verabreichung von Glukokortikoiden oder Tacrolimus wurde ebenfalls mit 10 Punkten gewertet. Falls systemische Glukokortikoide gegeben wurden, so war die Wertung abhängig von der täglichen Dosis. Mehr als 1 mg/kg wurde mit 40 Punkten gewertet, eine tägliche Dosis zw. 0,5 - 1 mg/kg erhielt 30 Punkte, eine tägliche Dosis zw. 0,2 - 0,5 mg/kg erhielt 20 Punkte und eine tägliche Dosis  $<0,2$  mg/kg wurde mit 10 Punkten gewertet (MUELLER et al., 2004a) (siehe Anhang 7).

3) ein Global Assessment Score (nur an Tag 90 und 120): Die Besitzer mussten den Zustand ihres Hundes im Vergleich zum vorherigen Besuch beurteilen, wobei sie fünf Möglichkeiten der Einteilung hatten: Verschlechterung (= 0), keine Veränderung (= 1), leichte Verbesserung (= 2), zufriedenstellende Verbesserung (= 3), vollständiger Rückgang der Symptomatik (= 4) (siehe Anhang 8).

4) Fragebogen zur Lebensqualität der Hunde (nur an Tag 0 und 120): Insgesamt 15 Fragen mit je fünf Antwortmöglichkeiten, die von "trifft überhaupt nicht zu" bis "trifft absolut zu" rangierten und mit Punkten von 0 bis 4 bewertet wurden. Je höher die Punktzahl war, desto schlechter war die Lebensqualität der Hunde einzustufen (FAVROT et al., 2010a) (siehe Anhang 9).



Aus den Punkten der Juckreizskala, des Medication Score und des CADESI wurde für jeden Studienbesuch ein Gesamtscore erstellt.

## 7. Labordiagnostik

Für die Antikörperbestimmung wurde den Hunden bei Studienbeginn und -ende jeweils eine Blutprobe von 10 ml mittels Venenpunktion entnommen. Das Blut wurde bei 4000 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten zentrifugiert und das so gewonnene Serum in Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und anschließend bei -20°C eingefroren.

### 7.1. Enzyme linked immunosorbent essay (ELISA)

Um zu evaluieren, ob eine Antikörperbildung stattfand, wurde ein indirekter ELISA durchgeführt, wobei Virbagen® omega als Antigen verwendet wurde. Auf Nachfrage beim Hersteller wurde die spezifische Aktivität mit nicht weniger als 0,17 Millionen I.E./µg und nicht mehr als 0,27 Millionen I.E./µg Protein angegeben. Daraus ergibt sich bei 10 Millionen I.E./ml ein Proteingehalt zwischen 37 µg und 58,8 µg pro ml. Für den Versuch wurde der Einfachheit halber mit einem Proteingehalt von 50 µg/ml gerechnet.

Die im ELISA verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Hersteller aller Reagenzien, die nicht im Labor selbst hergestellt wurden, sind in Anhang 10 zu finden.

**Tabelle 2: Im ELISA verwendete Reagenzien**

Beschichtungspuffer	50 mM Natriumcarbonat Puffer, pH 9,6
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
Blockierer	3 g bovines Serumalbumin (BSA) in 100 ml PBS
Probenverdünner	1 Teil Reagent Diluent Concentrate 2 (10x) und 10 Teile PBS
PBS-T	PBS mit 0,05 % Tween® 20

### Arbeitsschritte des ELISA:

#### 1) Beschichtung der Platten mit Virbagen® omega:

0,8 ml Virbagen® omega wurden mit 19,2 ml Beschichtungspuffer verdünnt, so dass 20 ml Lösung entstanden, die 2 µg rFeIFN- $\omega$ /ml enthielt. Von dieser Lösung wurden jeweils 100 µl in die Vertiefungen von zwei 96-Loch-ELISA-Platten pipettiert und das Ganze bei 4°C über Nacht inkubiert.

#### 2) Blockierung mit bovinem Serumalbumin (BSA):

Die Platten wurden mit je 100 µl des Blockierers über Nacht bei 4°C geblockt.

#### 3) Serumverdünnung und Inkubation:

Es wurden je 25 µl Serum mit 75 µl Probenverdünner verdünnt und in die einzelnen Plattenvertiefungen aufgetragen. Von jedem Studienpatienten wurden von beiden Serumproben Dreifachansätze auf die Platten pipettiert. Die Platten mit dem Serum wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert.

#### 4) Hinzufügen des Zweitantikörpers:

Als nächster Schritt wurde den ELISA-Platten ein zweiter, gegen canines IgG gerichteter, Peroxidase-konjugierter polyklonaler Antikörper zugefügt. Das Antikörper-Lyophilisat wurde zunächst nach Herstellerangaben mit deionisiertem Wasser rekonstituiert und anschließend 1:10.000 mit PBS-T verdünnt (2 µl Antikörperlösung in 20 ml PBS-T). Von dieser Verdünnung wurden den Vertiefungen je 100 µl zugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

#### 5) Hinzufügen des Substrates und Messung der Extinktion des Farbumschlags:

Jeder Vertiefung wurden je 100 µl TMB-Substrat zugefügt. Nach zehn Minuten wurde die Reaktion mit je 50 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Extinktion bei 450 - 595 nm mittels ELISA-Reader abgelesen.

Zwischen den Arbeitsschritten 1 - 5 wurden die Platten jeweils viermal mit PBS-T gewaschen. Während des Inkubierens wurden die Platten mit Parafilm abgedeckt.

Eine Negativkontrolle des indirekten ELISA wurde durchgeführt, indem alle oben genannten Arbeitsschritte exakt reproduziert wurden, nur dass Arbeitsschritt 1) entfiel.

### **7.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Um die Reinheit von Virbegan<sup>®</sup> omega zu bestimmen, wurde im physiologischen Institut der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München eine Auftrennung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (= sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = SDS-PAGE) durchgeführt. 20 µl Virbagen<sup>®</sup> omega wurden durch Hinzufügen von 10 µl Lämmli Puffer mit Mercaptoethanol reduziert und durch anschließendes Aufkochen bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Es wurde ein 15 % Gel verwendet. Die entstandenen Proteinbanden wurden mittels Coomassie-Blau angefärbt.

### **7.3. Massenspektrometrie**

Zur weiteren Identifizierung der bei der SDS-PAGE entstandenen Proteinbanden wurden diese ausgeschnitten und an das Institut für Klinische Chemie, Campus Forschung N 27, Universitäts-Klinikum Hamburg Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg geschickt. Dort wurde nach folgendem Prinzip verfahren:

Die Proteine im Gel wurden nach Reduktion mit Dithiothreitol und Modifikation der Cystein-Reste mit Iodacetamid mit Hilfe von Trypsin verdaut. Im Anschluss fand eine wiederholte Extraktion der Proteine aus dem Gel mittels Acetonitril und Ameisensäure statt. Die kombinierten Extrakte wurden getrocknet, in Methanol und Ameisensäure wieder aufgelöst, entsalzen, mit Methanol und Ameisensäure eluiert und im Anschluss mittels Nano-Elektrospray Tandem-Massenspektrometrie an einem Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer analysiert. Dabei wurden zuerst mit dem Quadrupol einzelne Peptide aus dem tryptischen Verdau selektiert und in einer nachgeschalteten Stoßzelle fragmentiert. Die Fragmentmassen wurden anschließend mit einem Flugzeit-Massenanalysator detektiert. Mit Hilfe der entstandenen MS/MS-Spektren der einzelnen Peptide wurden die Proteine durch Mascot-Datenbanksuche identifiziert. Peptide, die nicht mittels Mascot-Datenbanksuche identifiziert werden konnten, wurden manuell ausgewertet.

## **8. Statistik**

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde ein gepaarter T-Test für normal verteilte Daten und ein Wilcoxon matched pairs signed ranks test (= Wilcoxon Rangsummentest) für nicht normal verteilte Daten verwendet. Ein P-Wert < 0,05

wurde als signifikant gewertet.

Der Kruskal Wallis test mit anschließendem Dunn's multiple comparison post test wurde verwendet, um die beiden Gruppen untereinander zu vergleichen.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Patienten

An der Studie nahmen 26 Hunde 16 unterschiedlicher Rassen teil. Die Rassen und die jeweilige Zahl der Hunde dieser Rasse sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Hunderassen und Anzahl**

Rasse	Anzahl
Golden Retriever	5
Zwergschnauzer	1
Deutscher Schäferhund	2
Mops	2
Zwergpudel	1
Labrador	2
Basenji	1
Bolonka Zwetna	1
Foxterrier	1
Petit Griffon	1
Welsh Terrier	1
Frz. Bulldogge	1
Magyar Vizsla	1
Amerikanische Bulldogge	1
West Highland White Terrier	1
Mischling	4

Mit 18 Hunden überwog das männliche Geschlecht deutlich vor dem weiblichen mit acht Hunden, wobei bei den männlichen Tieren elf kastriert waren und bei den weiblichen fünf.

Der jüngste Studienpatient war 1,7 Jahre alt, der älteste 12,6 Jahre. Das mittlere Alter der Hunde betrug 6,3 Jahre (in Gruppe 1 (s.c.) 6,6 Jahre, in Gruppe 2 (oral) 6 Jahre).

### **1.1. Nebenwirkungen**

Von den 26 Hunden, die an der Studie teilnahmen, beendeten nur 25 die Studie. Ein Patient aus der oralen Gruppe verstarb kurz vor Studienende an einer Sepsis in Folge einer Notoperation wegen eines rupturierten Magengeschwürs. Die zweite Blutprobe konnte jedoch noch gewonnen werden. Das Magengeschwür konnte nicht mit der IFN-Therapie in Zusammenhang gebracht werden. Vorberichtlich vertrug der Hund schon lange keine nicht steroidalen Antiphlogistika oder Cortisonpräparate, da diese Erbrechen, Durchfall und ein dolentes Abdomen verursachten. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass das Magengeschwür schon länger vorlag.

Auch bei den restlichen Patienten traten keine Nebenwirkungen auf, die eindeutig mit Virbagen® omega in Verbindung gebracht werden konnten. Insgesamt sieben Hunde (drei aus Gruppe 1 und vier aus Gruppe 2) zeigten im Studienverlauf eine oder mehrere Durchfallepisoden. Bis auf zwei Hunde handelte es sich dabei um Tiere, die laut Besitzer und Krankengeschichte immer wieder an selbstlimitierenden Durchfallepisoden litten. Bei den beiden anderen Hunden trat der Durchfall direkt nach einer Futterumstellung auf. Bei allen Hunden handelte es sich um kurze Episoden zwischen einem Tag und einer Woche, die selbstlimitierend waren, bis auf einen Hund, der intermittierenden Durchfall über einen Monat zeigte. Nach einer dreitägigen Behandlung mit Fenbendazol verschwand dieser Durchfall jedoch wieder, was auf einen eventuellen Endoparasitenbefall z.B. mit Giardien hindeutet. Bei einem der Hunde, der laut Besitzer auch immer wieder Durchfallepisoden zeigte, wurde einige Zeit nach Studienende ein metastasierendes Prostataadenokarzinom diagnostiziert, welches möglicherweise auch der Durchfallauslöser war.

Zwei Hunde zeigten Erbrechen, welches in beiden Fällen jedoch nur einen Tag andauerte. Bei einem Hund aus der oralen Gruppe trat es ca. drei Wochen nach

Studienbeginn auf, bei dem anderen Hund aus der s.c. Gruppe an Tag 55. Da die Dauer der Symptomatik so kurz war und kein Zusammenhang mit der Medikamentenverabreichung hergestellt werden konnte (bei dem Hund aus Gruppe 1 war die letzte Medikamentenverabreichung 20 Tage her, der Hund aus Gruppe 2 bekam die orale Dosis bereits seit drei Wochen), wurde auch hier davon ausgegangen, dass es sich nicht um Nebenwirkungen von Virbagen® omega handelte.

Ein Hund aus der oralen Gruppe zeigte laut Besitzer ein reduziertes Allgemeinbefinden, welches jedoch schon vor Studienbeginn aufgefallen war. Bei der allgemeinen klinischen Untersuchung zwei Wochen nach Studienbeginn zeigte sich der Patient munter und aufmerksam und es waren keine Veränderungen feststellbar. Es wurde dennoch ein Differentialblutbild und Serumprofil angefertigt. Die einzige Veränderung war eine geringgradige Lymphozytose von  $5,2 \times 10^9/l$  (Referenzbereich  $1,0 - 3,6 \times 10^9/l$ ), die entweder aktivitäts- oder stressbedingt war und durch Freisetzung der Lymphozyten aus dem Marginalpool hervorgerufen wurde, oder auf einen geringgradigen Infektionsherd hindeutete. Dem Hund ging es im weiteren Studienverlauf gut. Ein Zusammenhang mit dem verabreichten Interferon, das eigentlich eher zu einer Lymphopenie führen müsste, konnte nicht festgestellt werden.

## **1.2. Allergien**

15 Studienpatienten (zwölf aus Gruppe 1 und drei aus Gruppe 2) litten an einer diagnostizierten CAD sensu stricto. Bei acht Patienten (drei aus Gruppe 1 und fünf aus Gruppe 2) wurde eine Kombination aus Futtermittel- und Umweltallergie diagnostiziert (CAD sensu lato).

Bei drei Patienten (alle aus Gruppe 2) ist unbekannt, ob sie an einer Futtermittelallergie, einer Umweltallergie oder einer Kombination aus beiden litten. Bei zwei dieser drei Patienten wurde auf Besitzerwunsch keine Eliminationsdiät durchgeführt, bei einem wurde die Diät durchgeführt, es fand aber keine Provokation mit dem vorherigen Futter statt.

## **1.3. Eliminationsdiät**

Neun Patienten (fünf aus Gruppe 1 und vier aus Gruppe 2) wurden während der Dauer dieser Studie einer Eliminationsdiät unterzogen. Drei dieser Patienten (aus Gruppe 1) waren bei der Provokation mit dem alten Futter negativ, d.h. sie litten

an einer CAD sensu stricto. Fünf Patienten (zwei aus Gruppe 1 und drei aus Gruppe 2) waren bei der Provokation positiv, unter der Diät aber nicht symptomlos, daher litten diese Patienten an einer Kombination aus Futtermittel- und Umweltallergie. Bei einem Hund (aus Gruppe 2) wurde aufgrund mangelnder Kooperation durch die Besitzer keine Provokation durchgeführt.

#### **1.4. Begleitende Therapien außerhalb des Medication Score**

ASIT und Antibiotika, die zur Behandlung von Pyodermien eingesetzt wurden, wurden nicht mittels Medication Score bewertet.

Sechs der Hunde (fünf aus Gruppe 1 und einer aus Gruppe 2) mit diagnostizierter CAD sensu stricto wurden während der Dauer der Studie desensibilisiert.

##### **1.4.1. Pyodermien und Antibiotika bei Studienbeginn**

Insgesamt hatten zu Studienbeginn fünf Hunde eine Pyodermie (vier aus Gruppe 1 und einer aus Gruppe 2).

In Gruppe 1 zeigten zwei der vier Hunde nur eine geringgradige und lokalisierte Pyodermie, ein Hund an den Lefzen und ein Hund an einer Hinterpfote. Da bei beiden Hunden nur eine Stelle betroffen war, die lokal mit Chlorhexidin-haltigem Shampoo und nicht mit Antibiotika behandelt wurde, dürften CADESI und Juckreizskala nicht beeinflusst worden sein. Die anderen zwei betroffenen Hunde in Gruppe 1 litten unter einer generalisierten Pyodermie, die bei einem der Hunde noch durch eine Malasseziendermatitis verschlimmert wurde. Diese Hunde wurden beide systemisch mit Cefalexintabletten (25 mg/kg KGW bid) behandelt. Der Hund, der zusätzlich unter einer Malasseziendermatitis litt, wurde zusätzlich topisch mit Miconazol- und Chlorhexidin-haltigem Shampoo behandelt. Bei diesen beiden Patienten ist davon auszugehen, dass ein großer Anteil des Juckreizes und der Läsionen durch die Pyodermie und die Malasseziendermatitis ausgelöst wurde und somit auch ein Großteil der initialen klinischen Verbesserung der antibiotischen und antifugalen Therapie zuzuschreiben ist. Ein betroffener Hund in Gruppe 2 litt zu Studienbeginn ebenfalls an einer generalisierten Pyodermie und Malasseziendermatitis und wurde entsprechend behandelt (siehe oben).

Vereinzelt traten auch während der Dauer der Studie Pyodermien auf, diese wurden je nach Schweregrad topisch oder systemisch behandelt. Bei Studienende



litten drei Hunde in Gruppe 1 an einer generalisierten Pyodermie, die mit Antibiotika behandelt werden musste, in Gruppe 2 hatte kein Hund bei Studienende eine behandlungsbedürftige Pyodermie.

### **1.5. Ausnahmen**

Bei insgesamt drei Patienten wurde eine Ausnahme gemacht, was die systemische Verabreichung von Cortisonpräparaten angeht.

Ein Hund aus der oralen Gruppe bekam dauerhaft, schon vor Beginn der Studie eine sehr niedrige Dosierung Prednisolon oral. Da sich durch Absetzen des Medikaments das klinische Bild drastisch verschlechterte und die Dosis, die benötigt wurde, um die Allergie im Griff zu halten, sehr gering war, wurde der Hund trotz oraler Cortisonverabreichung in die Studie eingeschlossen, da eine solch geringe Dosis (bei Studienbeginn betrug die Dosis 0,26 mg/kg KGW jeden zweiten Tag) eine Antikörperbildung nicht beeinträchtigen sollte.

Bei einem Hund aus der s.c. Gruppe verschlimmerte sich das Krankheitsbild kurz nach dem zweiten Studienbesuch beträchtlich, sodass die systemische Verabreichung eines Cortisonpräparates (Dexamethason 0,1 mg/kg KGW jeden zweiten Tag) aus ethischen Gründen unvermeidlich war, um dem Patienten Schmerzen und Leiden zu ersparen. Die Studie wurde dennoch fortgeführt, wobei nur die klinischen Daten ausgewertet wurden. Bei der Auswertung des ELISA zur Antikörperbestimmung wurde dieser Hund nicht berücksichtigt, da durch die hohe Dosis Dexamethason die Antikörperbildung evtl. unterdrückt wurde.

Bei einem Hund wurde das orale Prednisolon erst zwei Wochen vor Studienbeginn ausgeschlichen, sodass die letzte, sehr niedrige Prednisolongabe (0,3 mg/kg KGW jeden zweiten Tag) eine Woche vor Studienbeginn stattfand. Dies war aus logistischen Gründen nicht vermeidbar.

Bei einem Hund wurde nach Beendigung der Studie ein Morbus Cushing diagnostiziert. Der Verdacht bestand schon vor Studienbeginn, ein ca. drei Wochen nach Studienbeginn durchgeführter "Low-Dose Dexamethasone Suppression" (LDDS)-Test verlief jedoch negativ. Da der Hund zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Studie bereits beendet hatte, der nach Studienbeginn durchgeführte LDDS-Test negativ war und die gemessenen Cortisolwerte auch nach Studienende nur vergleichsweise geringgradig erhöht waren (der basale Cortisolwert betrug 5,1 µg/dl, der Referenzbereich erstreckt sich von

0,9 - 4,5 µg/dl), wurde er dennoch bei der Studiauswertung mit einbezogen.

## **2. Klinische Daten**

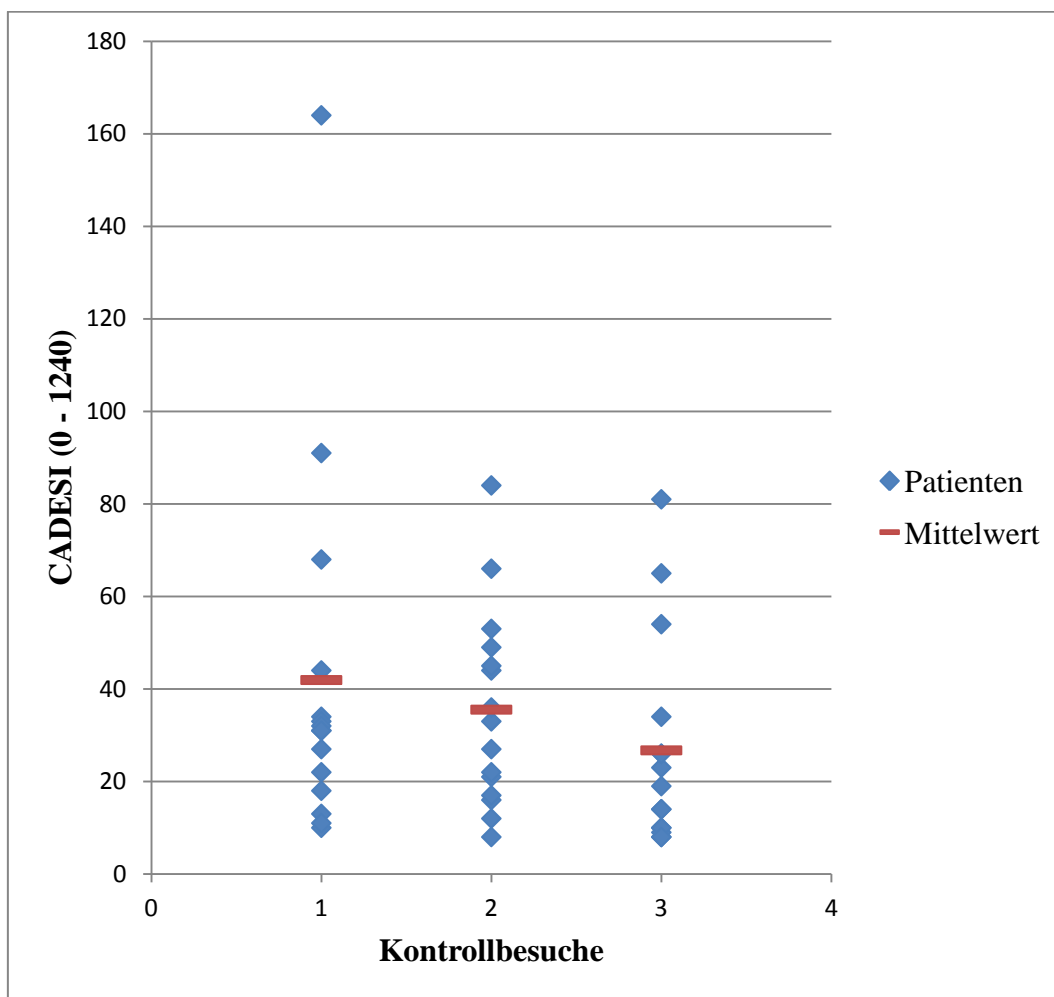
### **2.1. CADESI**

Bei der Auswertung der Daten fiel auf, dass sich trotz Randomisierung der Mittelwert der CADESIs an Tag 0 zwischen den beiden Gruppen unterschied. Er war mit einem Wert von rund 41,9 in der s.c.-Gruppe höher als in der oralen Gruppe mit einem Wert von rund 26,2. Ein Vergleich mittels Kruskal Wallis test und anschließendem Dunn's multiple comparison post test zeigte jedoch, dass dieser Unterschied nicht signifikant war.

Von insgesamt 15 Patienten, die rFeIFN- $\omega$  subkutan erhielten, verbesserte sich der CADESI bis zum Studienende bei elf. Ein Patient hatte nach vier Monaten denselben CADESI wie zu Beginn. Bei drei Patienten kam es zu einer Verschlechterung. Eine Aufstellung der einzelnen CADESIs aller Patienten inklusive der individuellen prozentualen Verbesserungen bzw. Verschlechterungen zwischen erstem und letztem Studienbesuch sind Tabelle 4 zu entnehmen. Im Mittel sanken die CADESIs bei den Studienbesuchen vom Studienbeginn über den zweiten Besuch nach zwei Monaten bis zum Endbesuch kontinuierlich ab (siehe Abbildung 2).

**Tabelle 4: CADESI-Werte der einzelnen Patienten der s.c. Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung**

Patient	CADESI 1	CADESI 2	CADESI 3	Prozentuale Verbesserung zw. 1. und 3. CADESI	Prozentuale Verschlechterung zw. 1. und 3. CADESI
1	13	44	8	38 %	
2	34	53	14	58 %	
3	10	33	10	0 %	
4	31	49	9	71 %	
5	68	45	19	72 %	
6	33	36	81		145 %
7	91	84	65	29 %	
8	22	16	14	36 %	
9	11	27	23		109 %
10	18	17	10	44 %	
11	32	8	34		6 %
12	44	21	8	82 %	
13	164	66	54	67 %	
14	31	12	26	16 %	
15	27	22	26	4 %	



**Abbildung 2: Verteilung der CADESIs der s.c. Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert**

Zwischen erstem und letztem Studienbesuch verbesserte sich der Mittelwert aller CADESIs um 36 %, die Besserung war jedoch bei der Auswertung mittels Wilcoxon Rangsummentest knapp nicht statistisch signifikant. Die genauen Mittelwerte der CADESIs und deren Standardabweichung, sowie die prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und der P-Wert sind Tabelle 5 zu entnehmen.

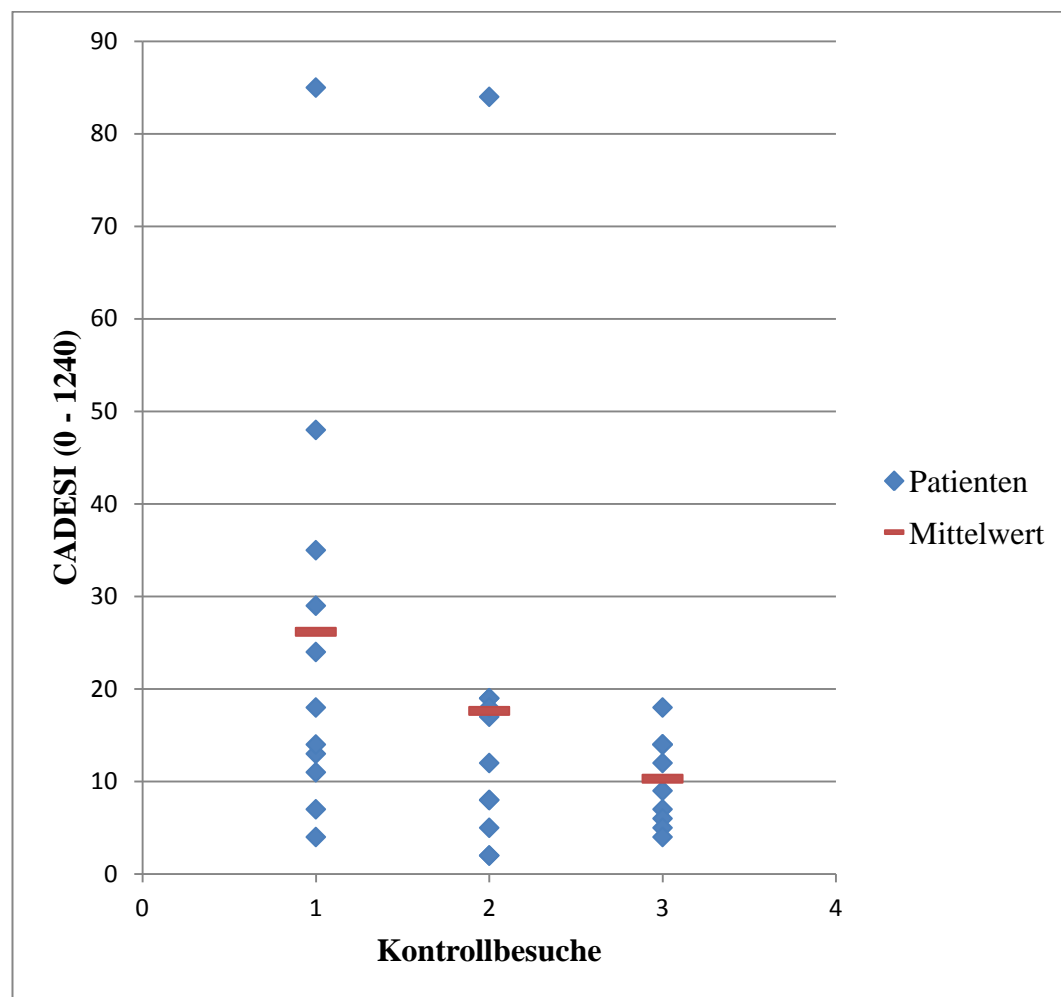
**Tabelle 5: CADESI Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SA) der drei Kontrollbesuche, prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und P-Wert der s.c. Gruppe**

	CADESI 1	CADESI 2	CADESI 3
MW	41,93	35,53	26,73
SA	40,07	21,44	22,65
Prozentuale Verbesserung zw. erstem und letztem Besuch	36 %		
P-Wert	0,0515		

In der oralen Gruppe verbesserte sich der CADESI bis zum Endbesuch bei acht Patienten, bei zwei Patienten kam es zu einer Verschlechterung. Bei einem Patienten konnte, wie zuvor bereits erwähnt, keine Abschlussuntersuchung durchgeführt werden, da er kurz vorher verstarb. Beim zweiten Studienbesuch war der CADESI dieses Hundes jedoch deutlich niedriger als bei Studienbeginn (siehe Tabelle 6). Die Mittelwerte der CADESIs zu den jeweiligen Studienbesuchen sanken auch in der oralen Gruppe kontinuierlich ab, sogar noch deutlicher als in der s.c.-Gruppe (siehe Abbildung 3).

**Tabelle 6: CADESI-Werte der einzelnen Patienten der oralen Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung**

Patient	CADESI 1	CADESI 2	CADESI 3	Prozentuale Verbesserung zw. 1. und 3. (2.) CADESI	Prozentuale Verschlechterung zw. 1. und 3. CADESI
1	85	84	14	84 %	
2	11	8	7	36 %	
3	18	2	12	33 %	
4	7	19	18		157 %
5	13	8	9	31 %	
6	24	17	6	75 %	
7	4	5	5		25 %
8	29	19	-	(34 %)	
9	48	18	14	71 %	
10	14	2	4	71 %	
11	35	12	14	60 %	



**Abbildung 3: Verteilung der CADESIs der oralen Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert**

Zwischen erstem und letztem Studienbesuch verbesserte sich der Mittelwert aller CADESIs um 61 %, die Besserung war statistisch signifikant. Die genauen Mittelwerte der CADESIs und deren Standardabweichung, sowie die prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und der P-Wert sind Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tabelle 7: CADESI Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche, prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und P-Wert der oralen Gruppe**

	CADESI 1	CADESI 2	CADESI 3
MW	26,18	17,64	10,30
SA	23,46	22,97	4,74
Prozentuale Verbesserung zw. erstem und letztem Besuch	61 %		
P-Wert	0,0414		

## 2.2. Juckreizskala (Pruritus Score)

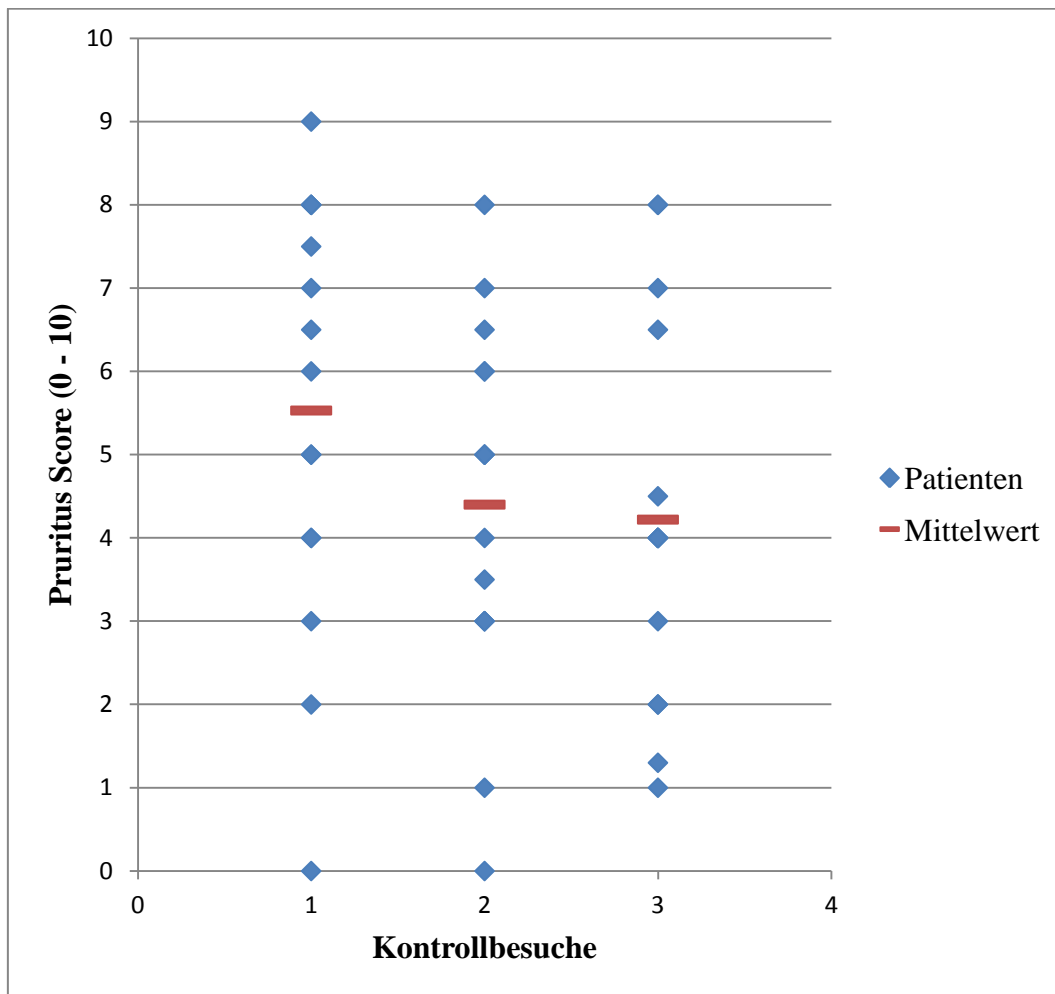
Zwischen den beiden Therapiegruppen war kein Unterschied festzustellen, zu Beginn der Studie betrug der durchschnittliche Pruritus Score der Hunde in beiden Gruppen rund fünf von zehn möglichen Punkten. Es gab sowohl Hunde, die sich verbesserten, als auch Hunde, bei denen der Juckreiz schlimmer wurde, wobei die Verbesserung bzw. Verschlechterung sich nicht immer konform zu Hautbild und CADESI verhielt.

In der s.c. Gruppe verbesserte sich der Juckreiz laut Besitzerangaben bei elf Hunden bis zum Ende der Studie, während drei Hunde bei Studienende mehr Juckreiz zeigten als zu Beginn. Bei einem Hund blieb der Juckreiz im Lauf der Studie konstant (siehe Tabelle 8). Die Mittelwerte aller Pruritus Scores zu den jeweiligen Studienbesuchen sanken zwar geringgradig ab, jedoch war dieser Unterschied bei der Auswertung mittels gepaartem T-Test nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 4 und Tabelle 9).



**Tabelle 8: Pruritus Scores der einzelnen Patienten der s.c. Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung**

Patient	Pruritus 1	Pruritus 2	Pruritus 3	Prozentuale Verbesserung zw. 1. und 3. Besuch	Prozentuale Verschlechterung zw. 1. und 3. Besuch
1	2	0	8		300%
2	6	6	2	67 %	
3	4	3	2	50 %	
4	4	3	1	75 %	
5	5	1	4	20 %	
6	7	6	4	43 %	
7	8	8	4	50 %	
8	8	7	7	13 %	
9	5	5	8		60 %
10	0	5	4		+
11	6,5	4	4,5	31 %	
12	7,5	3,5	4	47 %	
13	9	6,5	6,5	28 %	
14	8	5	1,3	84 %	
15	3	3	3	-	-



**Abbildung 4: Verteilung der Pruritus Scores der s.c. Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert**

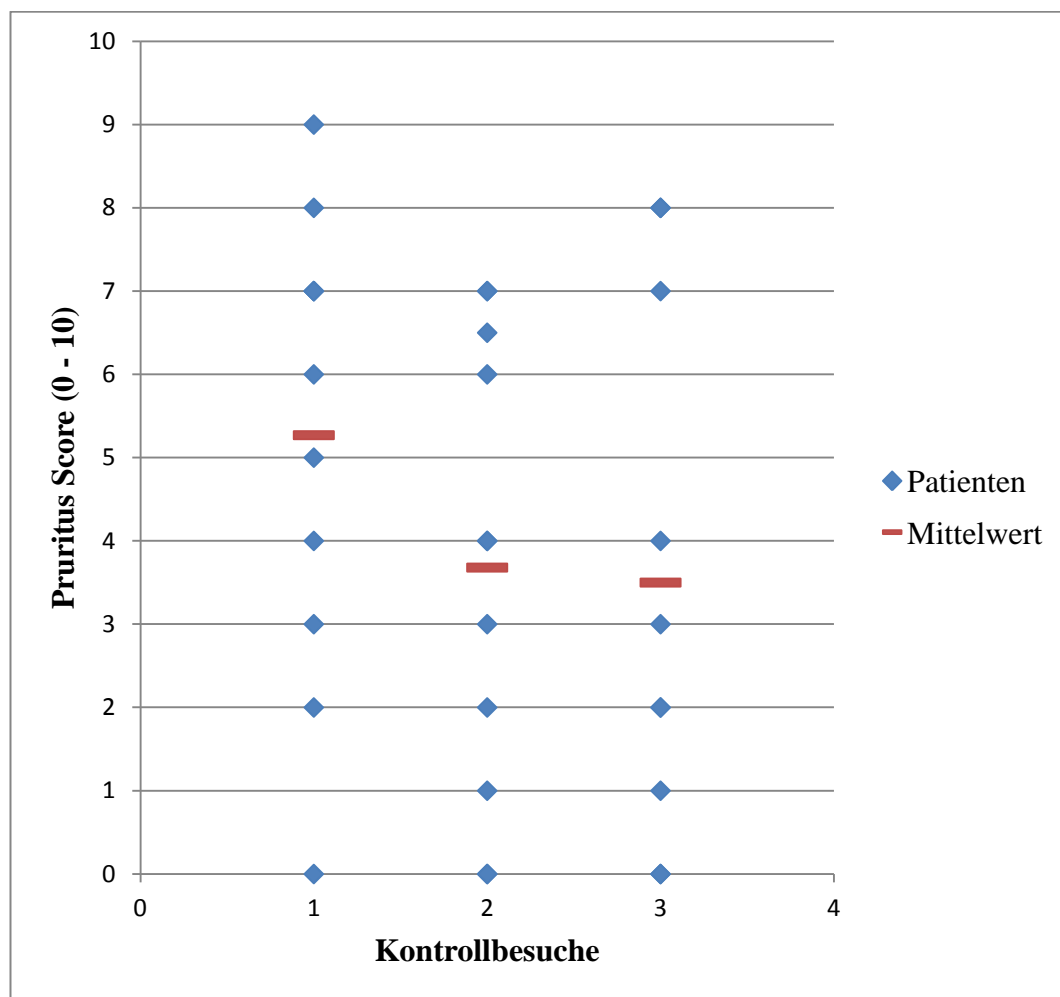
**Tabelle 9: Pruritus Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche, prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und P-Wert der s.c. Gruppe**

	Pruritus 1	Pruritus 2	Pruritus 3
MW	5,53	4,40	4,22
SA	2,57	2,21	2,27
Prozentuale Verbesserung zw. erstem und letztem Besuch	24 %		
P-Wert	0,1529		

In der oralen Gruppe verbesserte sich der Juckreiz im Verlauf der Studie bei sechs Patienten, bei zwei Hunden war der Juckreiz beim ersten und letzten Studienbesuch gleich und bei zwei Hunden verschlechterte sich der Juckreiz. Der Hund, der an einer Sepsis verstarb, zeigte beim zweiten Studienbesuch eine geringgradige Verbesserung (siehe Tabelle 10). Die Mittelwerte aller Patienten zu den einzelnen Studienbesuchen sanken im Verlauf der Studie, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 5 und Tabelle 11).

**Tabelle 10: Pruritus Scores der einzelnen Patienten der oralen Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung**

Patient	Pruritus 1	Pruritus 2	Pruritus 3	Prozentuale Verbesserung zw. 1. und 3. (2.) Besuch	Prozentuale Verschlechterung zw. 1. und 3. Besuch
1	7	6	4	43 %	
2	7	7	7	-	-
3	3	0	1	67 %	
4	7	7	8		14 %
5	2	1	0	100 %	
6	0	2	3		+
7	6	4	2	67 %	
8	4	3	-	(25 %)	
9	9	0	0	100 %	
10	5	4	2	60 %	
11	8	6,5	8	-	-



**Abbildung 5: Verteilung der Pruritus Scores der oralen Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert**

**Tabelle 11: Pruritus Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche, prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und P-Wert der oralen Gruppe**

	Pruritus 1	Pruritus 2	Pruritus 3
MW	5,27	3,68	3,50
SA	2,76	2,70	3,14
Prozentuale Verbesserung zw. erstem und letztem Besuch	34 %		
P-Wert	0,1		

### 2.3. Medication Score

Zwischen den beiden Gruppen war kein statistisch signifikanter Unterschied zu Studienbeginn festzustellen.

Sieben Patienten der s.c. Gruppe hatten bei Studienende denselben Score wie zu Studienbeginn, bei drei Patienten sank der Score zum Studienende und fünf Patienten hatten bei Studienende einen höheren Score als zu Studienbeginn (siehe Tabelle 12). Im Durchschnitt stiegen die Medication Scores etwas an, der Unterschied war jedoch bei der Auswertung mittels Wilcoxon Rangsummentest nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 12: Medication Scores aller Patienten der s.c. Gruppe bei den drei Studienbesuchen**

Patient	Medication Score 1	Medication Score 2	Medication Score 3
1	25	15	25
2	35	35	25
3	25	35	35
4	25	25	35
5	5	0	0
6	25	25	25
7	25	25	45
8	15	15	15
9	10	15	15
10	15	10	15
11	25	25	25
12	5	5	5
13	5	5	25
14	25	10	15
15	5	5	5

**Tabelle 13: Medication Score Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche inkl. P-Wert (Vergl. 1. und 3. Besuch) der s.c. Gruppe**

	Medication Score 1	Medication Score 2	Medication Score 3
MW	18,00	16,67	20,67
SA	9,96	11,13	12,37
P-Wert	0,3198		

In der oralen Gruppe hatten bei Studienende acht Patienten denselben Score wie zu Beginn, je ein Patient hatte einen niedrigeren bzw. höheren Score. Der Patient, der nicht zur Abschlussuntersuchung erschien, hatte beim zweiten Besuch einen niedrigeren Score als zu Beginn (siehe Tabelle 14). Auch in der oralen Gruppe stieg der durchschnittliche Medication Score bis zum letzten Besuch leicht an, auch hier war der Anstieg jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 15).



**Tabelle 14: Medication Scores aller Patienten der oralen Gruppe bei den drei Studienbesuchen**

Patient	Medication Score 1	Medication Score 2	Medication Score 3
1	35	45	45
2	35	35	35
3	20	10	15
4	0	0	0
5	25	25	25
6	5	5	5
7	5	5	5
8	5	0	-
9	0	0	0
10	15	15	15
11	10	15	10

**Tabelle 15: Medication Score Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche inkl. P-Wert (Vergl. 1. und 3. Besuch) der oralen Gruppe**

	Medication Score 1	Medication Score 2	Medication Score 3
MW	14,09	14,09	15,50
SA	13,00	15,14	15,17
P-Wert	1,0		

#### **2.4. Gesamtscore**

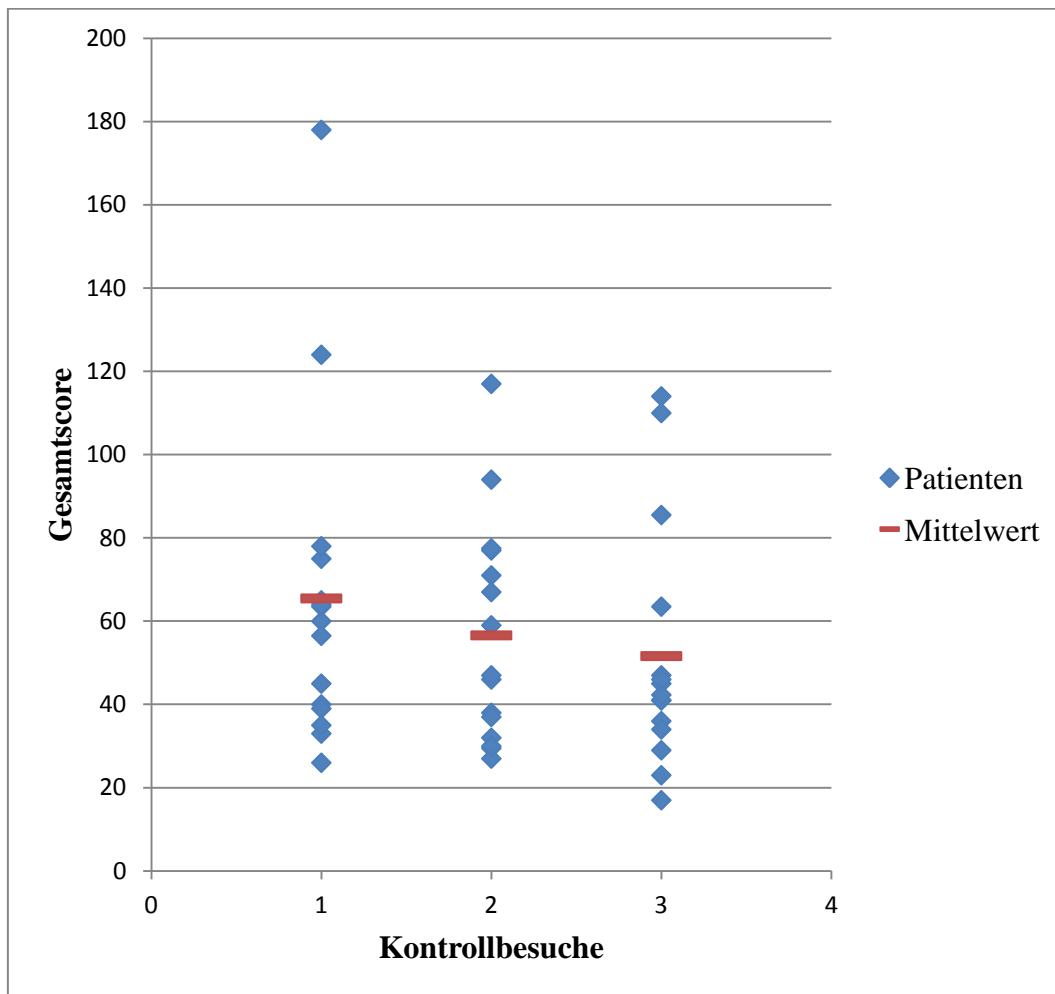
Durch die Kombination des CADESI, der Juckreizskala und des Medication Score sollten Verbesserungen in CADESI und Pruritus Score aufgrund von anderen Medikamenten relativiert werden, um so einen besseren Eindruck über die Verbesserung bzw. Verschlechterung des klinischen Gesamtbildes der Patienten zu gewinnen.

Der Gesamtscore sank zwischen Tag 0 und Tag 120 in der s.c. Gruppe bei zehn Patienten, wobei teilweise beim zweiten Besuch ein initialer Anstieg zu verzeichnen war. Ein Patient hatte bei Studienende denselben Score wie zu Beginn und bei vier Patienten stieg der Gesamtscore bis zum Studienende an (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16: Gesamtscores der einzelnen Patienten der s.c. Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung**

Patient	Gesamt-Score 1	Gesamt-Score 2	Gesamt-Score 3	Prozentuale Verbesserung zw. 1. und 3. Gesamtscore	Prozentuale Verschlechterung zw. 1. und 3. Gesamtscore
1	40	59	41		3 %
2	75	94	41	45 %	
3	39	71	47		21 %
4	60	77	45	25 %	
5	78	46	23	71 %	
6	65	67	110		69 %
7	124	117	114	8 %	
8	45	38	36	20 %	
9	26	47	46		77 %
10	33	32	29	12 %	
11	63,5	37	63,5	-	-
12	56,5	29,5	17	70 %	
13	178	77,5	85,5	52 %	
14	64	27	42,3	34 %	
15	35	30	34	3 %	

Der Mittelwert der Gesamtscores aller Patienten sank vom ersten bis zum letzten Besuch kontinuierlich ab. Diese Verbesserung war jedoch bei der Auswertung mittels Wilcoxon Rangsummentest nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 6 und Tabelle 17).



**Abbildung 6: Verteilung der Gesamtscores der s.c. Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert**

**Tabelle 17: Gesamtscore Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche inkl. prozentuale Verbesserung und P-Wert (Vergl. 1. und 3. Besuch) der s.c. Gruppe**

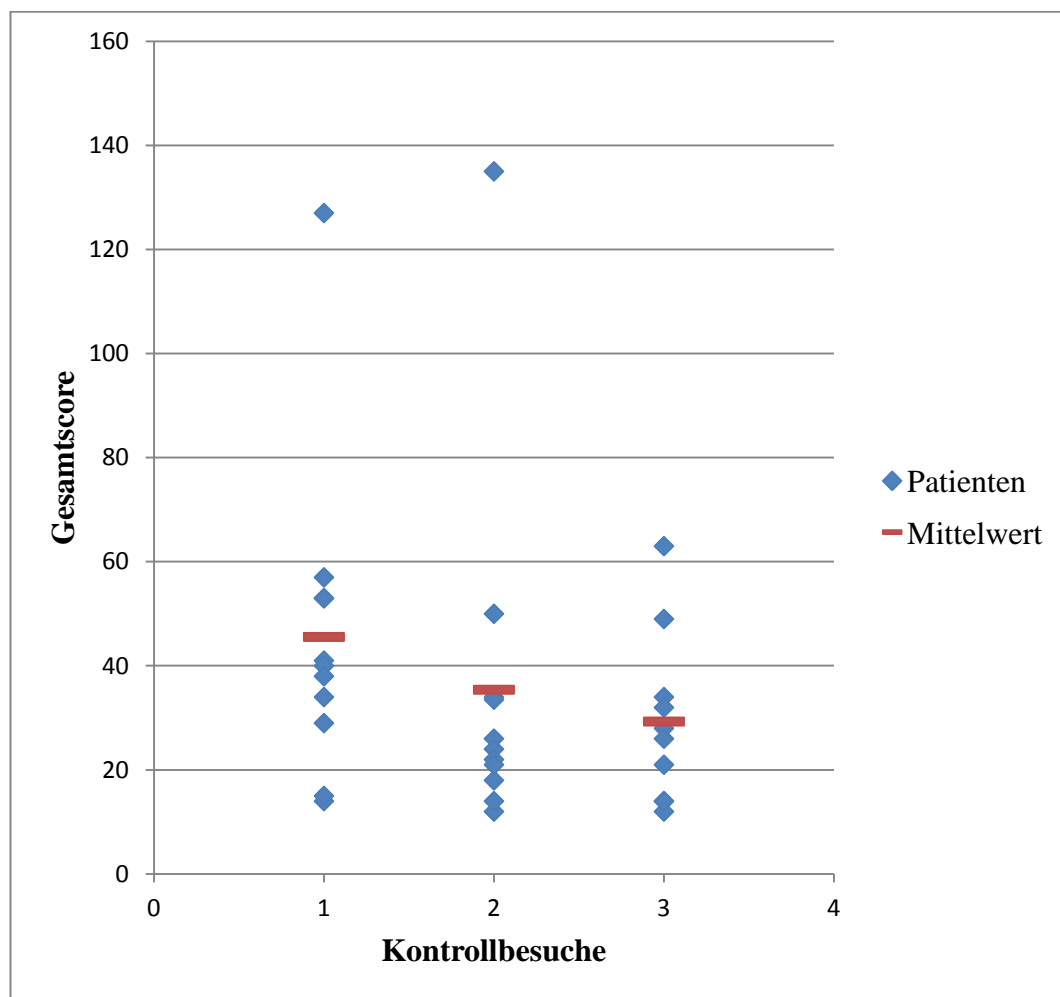
	Gesamtscore 1	Gesamtscore 2	Gesamtscore 3
MW	65,47	56,60	51,62
SA	39,43	26,83	29,38
Prozentuale Verbesserung zw. 1. und 3. Besuch	21 %		
P-Wert	0,0961		

In der oralen Gruppe war der Gesamtscore bei neun Hunden beim Studienendbesuch niedriger als bei Studienbeginn, bei einem Hund stieg er an. Der Hund, der die Studie nicht beendete, zeigte beim zweiten Besuch eine Verbesserung im Vergleich zum ersten Besuch (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18: Gesamtscores der einzelnen Patienten der oralen Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung**

Patient	Gesamt-Score 1	Gesamt-Score 2	Gesamt-Score 3	Prozentuale Verbesserung zw. 1. und 3. (2.) Gesamtscore	Prozentuale Verschlechterung zw. 1. und 3. Gesamtscore
1	127	135	63	50 %	
2	53	50	49	8 %	
3	41	12	28	32 %	
4	14	26	26		86 %
5	40	34	34	15 %	
6	29	24	14	52 %	
7	15	14	12	20 %	
8	38	22	-	(42 %)	
9	57	18	14	75 %	
10	34	21	21	38 %	
11	53	33,5	32	40 %	

Der Mittelwert der Gesamtscores aller Patienten der oralen Gruppe sank vom ersten bis zum letzten Besuch kontinuierlich ab. Diese Verbesserung war statistisch signifikant (siehe Abbildung 7 und Tabelle 19).



**Abbildung 7: Verteilung der Gesamtscores der oralen Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert**

**Tabelle 19: Gesamtscore Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche inkl. prozentuale Verbesserung und P-Wert (Vergl. 1. und 3. Besuch) der oralen Gruppe**

	Gesamtscore 1	Gesamtscore 2	Gesamtscore 3
MW	45,55	35,41	29,30
SA	30,53	34,72	16,34
Prozentuale Verbesserung zw. 1. und 3. Besuch	36 %		
P-Wert	0,019		

## 2.5. Global Assessment

An Tag 90 hatten in der s.c. Gruppe zwei Besitzer den Eindruck, dass ihr Hund sich klinisch verschlechtert hatte. Bei allen anderen Hunden der s.c. Gruppe hatten die Besitzer den Eindruck einer Verbesserung (siehe Tabelle 20).

An Tag 120 hatten drei Patientenbesitzer den Eindruck, dass ihr Hund sich seit dem letzten Besuch klinisch verschlechtert hatte. Zwei Besitzer kreuzten an, dass der Zustand ihres Hundes sich weder verbessert noch verschlechtert hätte, die restlichen Besitzer hatten den Eindruck der Zustand ihres Hundes habe sich mehr oder weniger gebessert (siehe Tabelle 20).

Die Angaben der Besitzer im Global Assessment Score stimmten nicht immer mit CADESI und Juckreiz überein.

Der durchschnittliche Global Assessment Score betrug in der s.c. Gruppe sowohl beim zweiten, als auch beim dritten Studienbesuch rund zwei Punkte, was einer leichten Verbesserung entspricht (siehe Tabelle 20).



**Tabelle 20: Global Assessment Scores der Patienten der s.c. Gruppe (0 = Verschlechterung, 1 = keine Veränderung, 2 = leichte Verbesserung, 3 = zufriedenstellende Verbesserung, 4 = vollständiger Rückgang der Symptomatik), inkl. Mittelwerte**

Patient	Global Assessment (2. Besuch)	Global Assessment (3. Besuch)
1	4	0
2	0	3
3	2	1
4	2	3
5	3	3
6	2	2
7	0	3
8	2	2
9	2	0
10	3	2
11	3	0
12	3	3
13	2	1
14	3	3
15	2	2
MW	2,20	1,87

In der oralen Gruppe hatte beim zweiten Studienbesuch ein Besitzer den Eindruck, dass sein Hund sich klinisch verschlechtert hätte, vier Besitzer kreuzten an, dass der Zustand ihres Hundes unverändert wäre und die restlichen Besitzer hatten den Eindruck einer Verbesserung (siehe Tabelle 21).

Bei Studienende hatte je ein Besitzer in der oralen Gruppe den Eindruck, dass sein Hund sich verschlechtert hätte bzw. dass keine Veränderung festzustellen wäre. Die restlichen acht Hunde zeigten laut ihren Besitzern eine Verbesserung (siehe Tabelle 21).

Der durchschnittliche Global Assessment Score betrug in der oralen Gruppe beim zweiten Besuch rund zwei Punkte (= leichte Verbesserung) und bei Studienende rund drei Punkte (= zufriedenstellende Verbesserung) (siehe Tabelle 21).

**Tabelle 21: Global Assessment Scores der Patienten der oralen Gruppe (0 = Verschlechterung, 1 = keine Veränderung, 2 = leichte Verbesserung, 3 = zufriedenstellende Verbesserung, 4 = vollständiger Rückgang der Symptomatik), inkl. Mittelwerte**

Patient	Global Assessment (2. Besuch)	Global Assessment (3. Besuch)
1	1	2
2	1	2
3	4	4
4	0	0
5	2	4
6	2	3
7	3	4
8	1	-
9	4	4
10	2	3
11	1	1
MW	1,91	2,70

Der Vergleich zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen zwischen Tag 0 und Tag 120 mittels Kruskal Wallis Test und anschließend Dunn's multiple comparison post test ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $P > 0,05$ ).

## **2.6. Lebensqualität**

In der s.c. Gruppe sank die im Lebensqualitäts-Fragebogen erreichte Punktzahl bei zehn Hunden. Bei vier Hunden war ein leichter Anstieg der Punktzahl zu sehen. Von einem Hund fehlte der Fragebogen des Endbesuches, da die Besitzer eine komplette Seite nicht ausgefüllt hatten. In der oralen Gruppe verbesserte sich die Lebensqualität bei drei Hunden, bei einem Hund war die Punktzahl beim Endbesuch genauso hoch wie zu Beginn, bei den restlichen sechs Hunden stieg die Punktzahl an. Auch in der oralen Gruppe fehlte ein Fragebogen vom Endbesuch, da, wie bereits erwähnt, ein Hund kurz vor Studienende verstarb. Eine Verbesserung oder Verschlechterung der Lebensqualität laut Fragebogen stimmte oft nicht mit dem CADESI, Pruritus Score, Gesamtscore und Global Assessment Score überein. Im Durchschnitt war weder in der oralen noch in der s.c. Gruppe ein großer Unterschied zwischen dem zu Beginn erzielten Ergebnis und dem Ergebnis bei Studienende festzustellen. In beiden Gruppen sank die Punktzahl im Durchschnitt geringfügig ab, was einer leichten Verbesserung der Lebensqualität entspricht (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23).

Der Vergleich zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen zwischen Tag 0 und Tag 120 mittels Kruskal Wallis Test und anschließendem Dunn's multiple comparison post test ergab auch hier keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $P > 0,05$ ).

**Tabelle 22: Punktzahl der Lebensqualitäts-Fragebögen der einzelnen Hunde der s.c. Gruppe (maximal erreichbare Punktzahl: 60)**

Patient	Lebensqualität (1. Besuch)	Lebensqualität (3. Besuch)
1	33	31
2	12	8
3	23	-
4	13	15
5	31	28
6	37	31
7	25	32
8	26	25
9	30	35
10	34	28
11	37	32
12	21	17
13	36	40
14	27	18
15	28	24
MW	27,5	26,0

**Tabelle 23: Punktzahl der Lebensqualitäts-Fragebögen der einzelnen Hunde der oralen Gruppe (maximal erreichbare Punktzahl: 60)**

Patient	Lebensqualität (1. Besuch)	Lebensqualität (3. Besuch)
1	34	26
2	18	11
3	24	27
4	18	19
5	5	7
6	10	14
7	20	23
8	35	-
9	31	20
10	11	11
11	20	27
MW	20,5	18,5

### **3. Labordiagnostik**

#### **3.1. Antikörpernachweis mittels ELISA**

Beim Antikörpernachweis mittels ELISA wurde Hund 7 aus der s.c. Gruppe nicht berücksichtigt, da er ab ca. der Hälfte der Studie mit Dexamethason behandelt wurde. Er ist deshalb in Tabelle 24 nicht mit aufgeführt.

Aus den Dreifachansätzen pro Patient wurde jeweils der Mittelwert errechnet. Dadurch sollten zufällige Schwankungen, die z.B. bei Abweichungen durch Pipettierfehler auftreten können, ausgeglichen werden, da sie das Ergebnis verfälschen könnten. Wenn im weiteren Verlauf von Extinktionen einzelner Patientenseren die Rede ist, sind damit immer die Mittelwerte der Dreifachansätze gemeint. Bei jedem Patienten wurde die Extinktion der Serumprobe des ersten Besuches mit der des letzten Studienbesuches verglichen. In der s.c. Gruppe sank die Extinktion bei sieben von 14 Tieren, also bei der Hälfte der Tiere, bei zwei Tieren kam es praktisch zu keiner Extinktionsänderung und nur bei fünf Tieren stieg die Extinktion, meist geringgradig an. In der oralen Gruppe sank die Extinktion nur bei zwei Tieren deutlich, bei vier Tieren gab es nur sehr geringgradige Änderungen in die eine oder andere Richtung und bei fünf Tieren kam es zu einem Extinktionsanstieg (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25). Betrachtet man den Mittelwert der Extinktionen aller Patienten einer Gruppe bei Studienbeginn und -ende, so ist in der s.c. Gruppe ein leichter Abfall und in der oralen Gruppe ein leichter Anstieg der Extinktionen zu sehen (siehe Tabelle 26 sowie Abbildung 8 und Abbildung 9).

**Tabelle 24: Extinktionen (450-595 nm) der einzelnen Patienten der s.c. Gruppe**

Patient	Extinktion der Serumprobe von Tag 0	Extinktion der Serumprobe von Tag 120	Extinktion der Negativkontrolle von Tag 0	Extinktion der Negativkontrolle von Tag 120
1	0,18	0,073	0,155	0,037
2	0,129	0,065	0,134	0,089
3	0,258	0,179	0,077	0,061
4	0,081	0,115	0,015	0,005
5	0,121	0,068	0,022	0,05
6	0,4	0,144	0,037	0,015
8	0,124	0,125	0	0,013
9	0,422	0,517	0,092	0,065
10	0,464	0,486	0,002	0,009
11	0,291	0,461	0,019	0,012
12	0,634	0,389	0,02	0,008
13	1,047	0,862	0,013	0,011
14	0,461	0,508	0,004	0,006
15	0,526	0,637	0,012	0,022

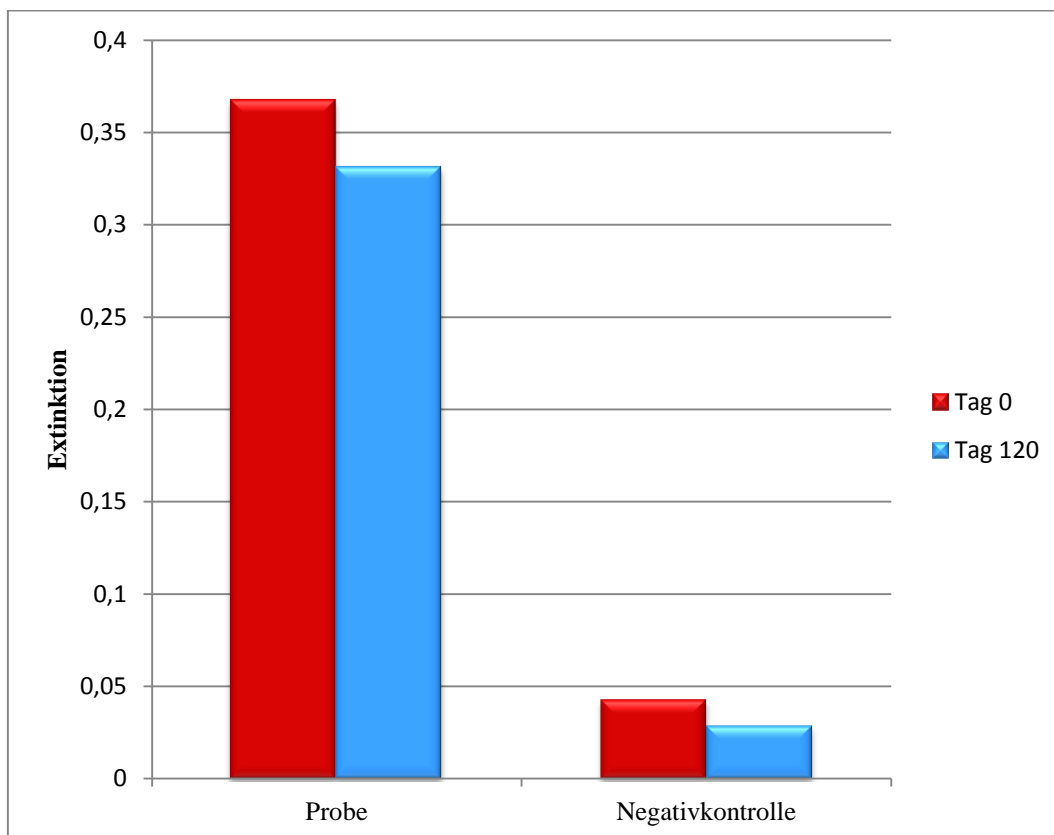


**Tabelle 25: Extinktionen (450-595 nm) der einzelnen Patienten der oralen Gruppe**

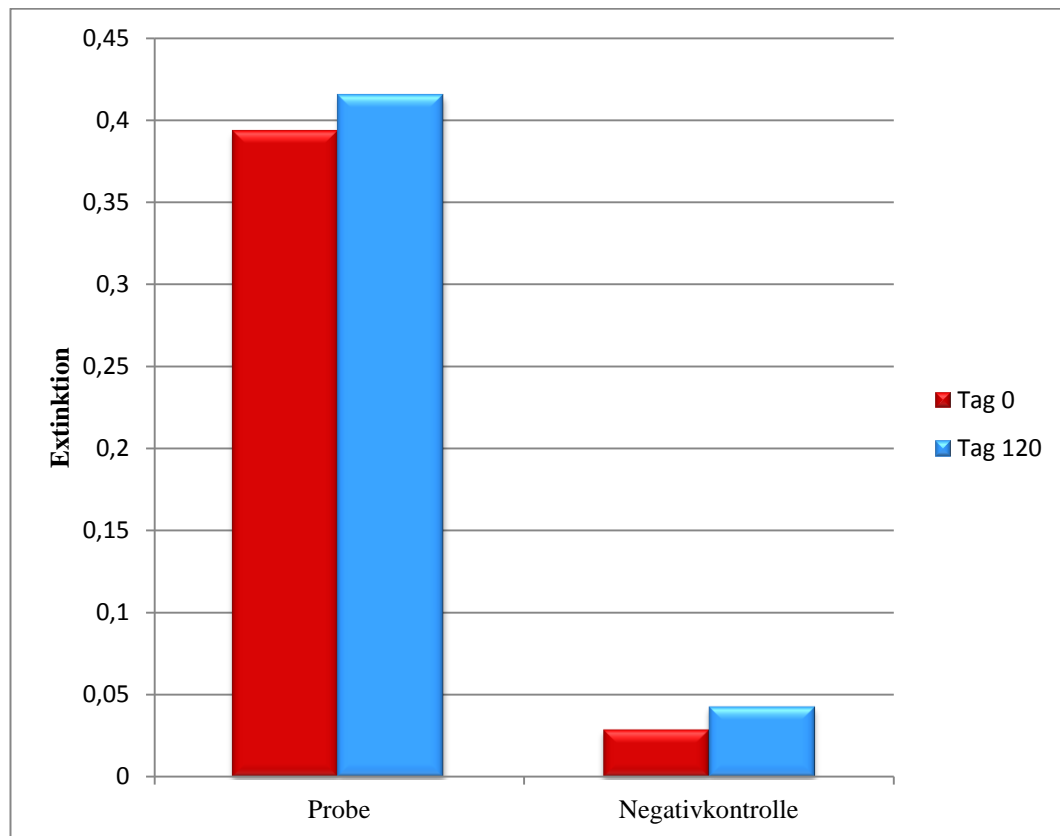
Patient	Extinktion der Serumprobe von Tag 0	Extinktion der Serumprobe von Tag 120	Extinktion der Negativkontrolle von Tag 0	Extinktion der Negativkontrolle von Tag 120
1	0,271	0,478	0,065	0,275
2	0,179	0,086	0,011	0,013
3	0,251	0,294	0,016	0,015
4	0,082	0,154	0	0
5	0,654	0,72	0,016	0,039
6	0,276	0,299	0,024	0,02
7	0,732	0,766	0	0,001
8	0,671	0,244	0,011	0,005
9	0,465	0,454	0,047	0,032
10	0,481	0,637	0,057	0,019
11	0,264	0,435	0,07	0,058

**Tabelle 26: Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Extinktionen (450-595 nm)**

Gruppe	Extinktion aller Seren Tag 0	Extinktion aller Seren Tag 120	Extinktion der Negativkontrolle Tag 0	Extinktion der Negativkontrolle Tag 120
MW s.c.	0,367	0,331	0,043	0,029
SA (s.c.)	0,262	0,254	0,051	0,027
MW oral	0,393	0,415	0,029	0,043
SA (oral)	0,219	0,225	0,026	0,079



**Abbildung 8: Mittelwerte der Extinktionen (450-595 nm) der s.c. Gruppe**

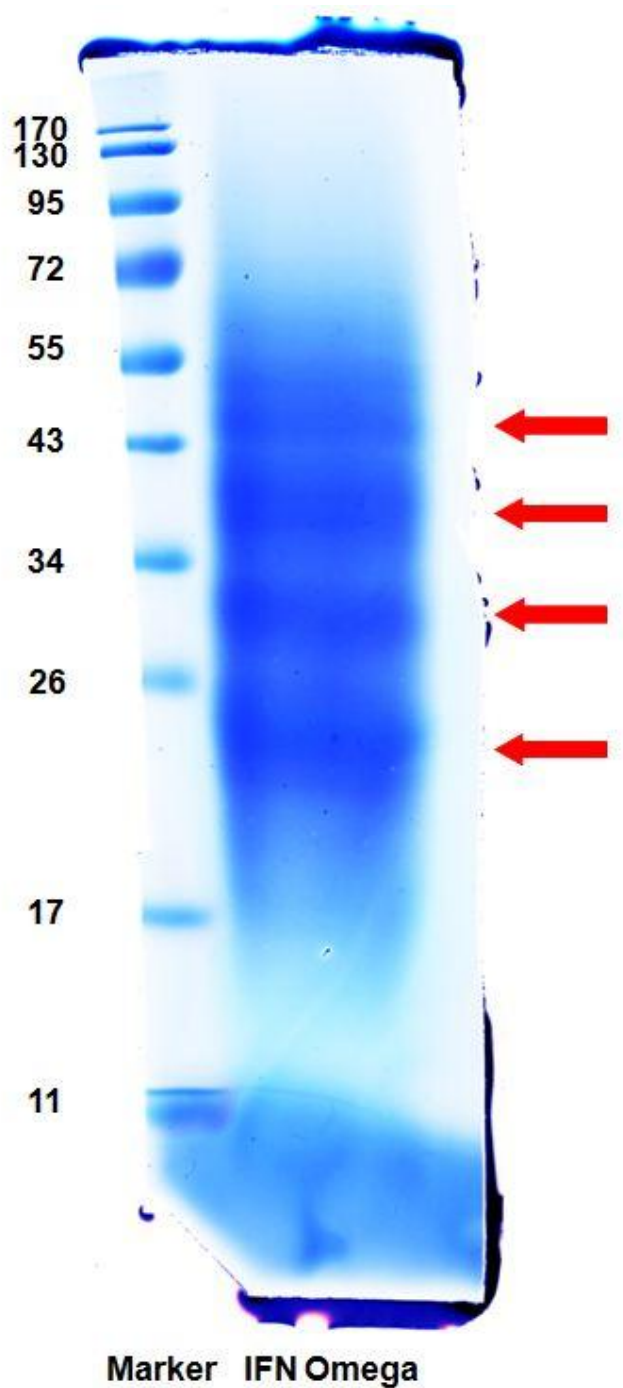


**Abbildung 9: Mittelwerte der Extinktionen (450-595 nm) der oralen Gruppe**

In beiden Gruppen war der Unterschied zwischen den Extinktionen des Serums von Tag 0 und Tag 120 nicht statistisch signifikant. In der s.c. Gruppe ergab die Auswertung mittels Wilcoxon Rangsummentest einen P-Wert von 0,3303. In der oralen Gruppe ergab die Auswertung mittels gepaartem T-Test einen P-Wert von 0,6814. Der Unterschied zwischen den Werten der jeweiligen Negativkontrollen und den entsprechenden Werten der Proben war hoch signifikant (Wilcoxon Rangsummentest  $P < 0,0001$ ).

### 3.2. SDS-PAGE

Bei der Auftrennung des Medikamentes Virbagen® omega mittels SDS-PAGE entstanden vier undeutliche Proteinbanden, mit einem Molekulargewicht von ca. 23-25, 30, 36-40 und 45-50 kiloDalton (kDa) (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Mittels Coomassie-Blau angefärbte Proteinbanden nach Auftrennung von Virbagen® omega mittels SDS-Page**

### **3.3. Massenspektrometrie**

Bei der ersten Proteinbande der SDS-PAGE, mit dem Molekulargewicht von ungefähr 23 bis 25 kDa handelte es sich um felines Interferon. Die restlichen drei Proteinbanden waren identisch, es handelte sich dabei um Kollagen ("Gelatine") von porciner Herkunft. Weitere Proteine konnten nicht nachgewiesen werden.

## **V. DISKUSSION**

In dieser randomisierten, offenen Feldstudie wurden insgesamt 26 Hunde mit AD über eine Dauer von vier Monaten mit rFeIFN- $\omega$  behandelt, um festzustellen, ob eine Antikörperbildung gegen das Medikament stattfindet. Dafür wurden 15 Hunde subkutan behandelt. Sie erhielten insgesamt acht Injektionen innerhalb von vier Monaten. Elf Hunde erhielten das Medikament täglich oral. An Tag 0 und Tag 120 wurden venöse Blutproben entnommen, aus denen Serum für die Antikörperbestimmung mittels ELISA gewonnen wurde. Zusätzlich wurden klinische Parameter erhoben, um die Wirksamkeit der subkutanen Verabreichung und der oralen Verabreichung von rFeIFN- $\omega$  zu vergleichen. Als Medikament und zur Beschichtung der ELISA-Platten wurde Virbagen® omega verwendet, welches nach Rekonstitution bzw. Verdünnung für maximal drei Wochen bei 4°C gelagert wurde.

Insgesamt verbesserten sich die Hunde sowohl in der s.c. Gruppe als auch in der oralen Gruppe klinisch, wobei nur die Verbesserung der oralen Gruppe statistisch signifikant war. Zwischen den im ELISA gemessenen Extinktionen der Serumproben die zu Studienbeginn und -ende gewonnen wurden, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

### **1. Wirksamkeit der Behandlung von CAD mit rFeIFN- $\omega$ im Gruppenvergleich**

#### **1.1. Patienten**

Hinsichtlich einer Rasseprädisposition für CAD lässt sich in dieser Studie aufgrund der kleinen Gruppengrößen und der geringen Anzahl an Hunden pro Rasse kein Aussage treffen. Auffällig ist nur die große Anzahl an Golden Retrievern im Vergleich zu den anderen Rassen. Golden Retriever gehören zu den Rassen, für die im Raum München eine Rasseprädisposition festgestellt werden konnte (JAEGER et al., 2010).

70 % der Studienpatienten waren männlich. Eine Geschlechtsprädisposition für CAD konnte bisher jedoch noch nicht bestätigt werden (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; GRIFFIN & DEBOER, 2001). Im Gruppenvergleich ist die Geschlechtsverteilung annähernd gleich mit 67 % männlichen Tieren in der s.c.

Gruppe und 73 % männlichen Tieren in der oralen Gruppe, was für eine erfolgreiche Randomisierung spricht.

Das durchschnittliche Alter der Patienten in den beiden Gruppen war annähernd gleich, mit 6,6 Jahren in der s.c. Gruppe und 6 Jahren in der oralen Gruppe. Das Alter sollte also im Vergleich der beiden Gruppen keine Auswirkungen auf das Ergebnis haben. Die Allergiesymptomatik begann bei 13 von 15 Hunden in der s.c. Gruppe und bei zehn von elf Hunden in der oralen Gruppe in einem Alter unter drei Jahren. Dies entspricht den bisherigen Erfahrungen und den Kriterien nach FAVROT und Mitarbeitern (2010a) (SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010b). Bei den drei Hunden, bei denen die Symptomatik erst später begann, wurden die ersten Symptome evtl. von den Besitzern nicht bemerkt, oder die Symptomatik begann tatsächlich erst später.

In der oralen Gruppe befanden sich mit fünf von elf Patienten mehr Hunde, die an CAD sensu lato litten, als in der s.c. Gruppe, in der nur drei Hunde an einer gemischten Allergie, ausgelöst sowohl durch Umwelt- als auch durch Futtermittelallergene, litten. Desweiteren war bei drei Patienten der oralen Gruppe die genaue Art der Allergie nicht bekannt. Somit litten nur drei Hunde aus der oralen Gruppe definitiv an einer CAD sensu stricto, während in der s.c. Gruppe zwölf Patienten an einer reinen Umweltallergie litten. Bislang wurde der Einsatz von IFN zur Therapie von Allergien nur bei CAD sensu stricto studiert (HASEGAWA et al., 2004; IWASAKI, 2004; IWASAKI & HASEGAWA, 2006; CARLOTTI et al., 2009; YASUKAWA et al., 2010). Ob IFN auch eine therapeutische Wirkung bei der Behandlung von CAD, die durch Futtermittelallergene ausgelöst wurde, besitzt, ist bislang nicht bekannt. Da sich das klinische Bild unabhängig von der Art der Allergene gleich präsentiert, ist zu vermuten, dass die zugrundeliegenden Pathomechanismen dieselben sind (OLIVRY et al., 2007a). Die Futtermittelallergie muss sich jedoch nicht als reine CAD präsentieren, es können auch andere Symptome wie z.B. gastrointestinale Symptome ausgelöst werden (OLIVRY et al., 2007a; PICCO et al., 2008). Daher ist nicht klar, ob bei einer bestehenden Futtermittelallergie die zugrundeliegenden Pathomechanismen immer dieselben sind, oder variieren und dadurch unterschiedliche Symptome hervorrufen. In einer 2011 veröffentlichten Studie wurde das Zytokinprofil in Haut mit Läsionen und läsionenfreier Haut von Hunden mit futtermittelinduzierter CAD bestimmt, wobei Unterschiede zwischen

futtermittelinduzierter CAD und umweltallergeninduzierter CAD festgestellt wurden. Jedoch wurde auch hier eine eher Th2-dominierte Immunantwort festgestellt. In läsionenfreier Haut von Hunden mit Futtermittelallergie wurde deutlich mehr IL-4 exprimiert als bei gesunden Hunden, während in Haut mit Läsionen die Expression von IFN- $\gamma$  zunahm (VEENHOF et al., 2011). Dies erinnert an den Wechsel der Th2-Immunantwort zur Th1-Immunantwort in chronischen Läsionen bei CAD sensu stricto. Es ist also nicht abwegig, dass IFN auch bei Futtermittelallergien, die sich als CAD präsentieren, einen positiven Effekt haben könnte. Da der Allergenkontakt bei der Futtermittelallergie vorwiegend im Magen-Darm-Trakt stattfindet, könnte die orale IFN-Therapie, bei der der erste Ansatzpunkt der Wirkung im lokalen lymphatischen Gewebe des Verdauungstraktes liegt (BEILHARZ et al., 1997; EID et al., 1999), evtl. eine erste Barriere gegen eine allergische Überreaktion darstellen. Es wäre daher vorstellbar, dass bei Futtermittelallergien die orale IFN-Therapie sogar besser wirkt als die subkutane IFN-Therapie. Eventuell ist dies einer der Gründe, weshalb in der oralen Gruppe bessere Ergebnisse erzielt wurden. Dies ist jedoch auf Grund der geringen Anzahl der Hunde Spekulation und es sind gezielte Studien zur Untersuchung der Wirkung von IFN bei der Therapie der futtermittelinduzierten CAD nötig, um eine definitive Aussage zu treffen. Da keiner der Hunde in dieser Studie mit bekannter Allergie-Ursache an einer rein futtermittelinduzierten CAD litt, ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob das IFN eine Verbesserung der futtermittelinduzierten oder der umweltinduzierten CAD verursacht hat.

Insgesamt neun Hunde wurden während der Studie einer Eliminationsdiät unterzogen, wobei im Endeffekt fünf der Hunde bei der Provokation mit dem ursprünglichen Futter eine Reaktion (vermehrten Juckreiz oder Hautrötungen) zeigten, also an einer teilweise durch Futtermittelallergene induzierten CAD litten. Bei diesen fünf Hunden ist davon auszugehen, dass die klinische Verbesserung teilweise durch die Eliminationsdiät bedingt ist. Zwei dieser fünf Hunde waren in der s.c. Gruppe und zeigten bei der Provokation eine relativ deutliche Verschlechterung. Einer dieser beiden Hunde bekam die Diät jedoch schon seit drei Monaten vor Studienbeginn, und die Provokation wurde zwischen zwei Besuchen durchgeführt. Die Diät sollte also keinen Einfluss auf die klinische Entwicklung während der Studie gehabt haben, da nach drei Monaten keine



weitere Verbesserung durch die Diät zu erwarten ist (ROSSER, 1993). Ebenso sollte die Provokation, da sofort wieder auf die Diät umgestellt wurde, als der Hund vermehrten Juckreiz zeigte, keine Verschlechterung der klinischen Daten bewirkt haben. Der andere Hund aus der s.c. Gruppe hatte die Diät bei Studienbeginn gerade erst begonnen. Die Verbesserung des klinischen Bildes im Verlauf der Studie ist daher bei diesem Hund teilweise auf die Eliminationsdiät zurückzuführen. In der oralen Gruppe reagierten drei Hunde bei der Provokation. Auch hier bekam ein Hund die Diät schon seit mehreren Monaten vor Studienbeginn, sodass sie sich nicht auf die klinischen Ergebnisse ausgewirkt haben sollte. Die beiden anderen Hunde zeigten nur eine sehr geringgradige Reaktion bei der Provokation, sodass die durch die Diät erzielte Verbesserung nicht stark ins Gewicht fallen sollte. Eventuell hatte bei diesen beiden Hunden die orale IFN-Therapie auch schon eine Verbesserung der futtermittelinduzierten Allergie bewirkt und die Verschlechterung durch die Provokation wäre deutlicher ausgefallen, wenn die Hunde kein IFN bekommen hätten. Bei einem weiteren Hund aus der oralen Gruppe, der eine Eliminationsdiät bekam, die kurz vor Studienbeginn gestartet wurde, fand keine Provokation mit dem ursprünglichen Futter statt, da dies von den Besitzern abgelehnt wurde. Es ist somit unklar, ob die klinische Verbesserung durch die Diät beeinflusst wurde. Somit hatte die Eliminationsdiät in der s.c. Gruppe nur bei einem Hund und in der oralen Gruppe bei zwei Hunden einen sehr geringgradigen bzw. bei einem Hund einen ungewissen positiven Effekt auf die Entwicklung der klinischen Daten. Die Ergebnisse des klinischen Teils der Studie waren also in beiden Gruppen geringgradig besser, als sie es ohne Eliminationsdiäten gewesen wären, die Verfälschung sollte jedoch nicht gravierend sein und sich im Gruppenvergleich nicht auswirken.

Sechs Patienten wurden während der Studie desensibilisiert, fünf aus Gruppe 1 und einer aus Gruppe 2. Welchen Einfluss die Desensibilisierung auf das Ergebnis hatte ist unklar, es gibt keine Möglichkeit herauszufinden, welche Therapie zu einer Besserung geführt hat. Da das Ziel der ASIT darin besteht, durch regulatorische Effekte die Imbalanz im Immunsystem aufzuheben und die Th2-dominierte Immunantwort in Richtung einer Th1-Immunantwort zu verschieben (KEPPEL et al., 2008), wäre eigentlich ein synergistischer Effekt zur IFN-Therapie zu erwarten. In der s.c. Gruppe wurden wesentlich mehr Hunde

desensibilisiert, daher wäre bei einem positiven Therapieeffekt durch die ASIT das Ergebnis in der s.c. Gruppe positiv verfälscht worden. Da jedoch auch nicht alle Hunde auf eine ASIT ansprechen (NUTTALL et al., 1998; SCHNABL et al., 2006), ist es unmöglich festzustellen, ob das Ergebnis der Studie durch die ASIT beeinflusst wurde.

Drei Hunde litten bei Studienbeginn an einer generalisierten Pyodermie bzw. Malasseziendermatitis. Durch Infektionen kann sich das Hautbild drastisch verschlechtern und es kann auch infektionsbedingt zu einer Verschlimmerung des Juckreizes kommen (SIMOU et al., 2005). Folglich kann es durch die während der Studie durchgeführte Antibiotika- und Shampootherapie zu einer Reduktion von CADESI und Juckreiz gekommen sein, die von der IFN-Therapie unabhängig war. Zwei der drei Hunde waren in der s.c. Gruppe (dies entspricht 13 % der Studienteilnehmer), einer in der oralen Gruppe (dies entspricht 9 % der Studienteilnehmer). Demzufolge dürfte der Einfluss der Pyodermie bzw. Antibiotikatherapie im Gruppenvergleich keine große Rolle gespielt haben. Ein deutlicher Unterschied war jedoch beim Endbesuch zu verzeichnen. Hier litten insgesamt drei Hunde an einer generalisierten Pyodermie, die mit Antibiotika behandelt werden musste. Alle drei Hunde waren in der s.c. Gruppe, in der oralen Gruppe litt bei Studienende kein Hund an einer generalisierten Pyodermie. Einer der drei Hunde hatte schon zu Beginn eine Pyodermie, die wesentlich ausgeprägter war als bei Studienende, wodurch sich auch die Verbesserungen von CADESI und Juckreiz bei diesem Hund trotz Pyodermie erklären lassen. Die beiden anderen Hunde zeigten an Tag 120 eine Verschlechterung im Gesamtscore im Vergleich zum ersten Besuch. Dieses Neuauftreten bzw. Persistieren der Pyodermien spricht für ein schlechteres Ansprechen auf die IFN-Therapie in der s.c. Gruppe.

Für einen schlechteren Therapieerfolg in der s.c. Gruppe spricht auch die Tatsache, dass ein Hund wegen starker Symptomverschlimmerung ab ca. der Hälfte der Studie mit Dexamethason behandelt werden musste, während das Prednisolon bei dem Hund in der oralen Gruppe, der dauerhaft schon vor Studienbeginn mit niedrig dosiertem Prednisolon behandelt werden musste, im Studienverlauf sogar um die Hälfte reduziert werden konnte, was durch eine Reduktion des Medication Scores in den Gesamtscore einfließt.

## 1.2. Klinische Daten

Der geringere CADESI-Mittelwert in der oralen Gruppe an Tag 0 (26 Punkte) im Vergleich zur s.c. Gruppe (42 Punkte), wenn auch nicht statistisch signifikant, könnte bedeuten, dass in der oralen Gruppe geringfügig mildere Allergiker vertreten waren. Der Unterschied bleibt auch bei der Betrachtung der Mediane bestehen, mit 31 Punkten in der s.c. Gruppe und 18 Punkten in der oralen Gruppe. Die Verbesserung des CADESI an Tag 120 im Vergleich zu Tag 0 war nur in der oralen Gruppe signifikant, was für ein besseres Ansprechen auf die Therapie in der oralen Gruppe spricht.

Pruritus und Medication Score waren zu Studienbeginn annähernd gleich. Auch beim Endbesuch war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht sehr groß, jedoch mit einer geringgradig besseren Tendenz in der oralen Gruppe im Vergleich zur s.c. Gruppe. In beiden Gruppen kam es beim Endbesuch zu einem leichten Anstieg des Medication Scores, während der Pruritus Score in beiden Gruppen sank. Es fiel auf, dass eine Verbesserung des CADESI nicht immer auch mit einem verbesserten Juckreiz einherging und umgekehrt. Dies könnte daran liegen, dass der Juckreiz in der Regel schneller auf Änderungen der allergischen Reaktion reagieren kann, während die Läsionen, insbesondere Alopezie, Lichenifikation und Exkorationen, länger brauchen, um sich zu erholen bzw. sich das Hautbild erst sekundär nach verschlimmertem Juckreiz verschlechtert.

Die Ergebnisse der Global Assessment Scores stimmten nicht immer mit den Gesamtscores überein. So zeigte der Gesamtscore bei manchen Patienten eine Verschlechterung, die Besitzer gaben jedoch trotzdem eine Verbesserung des Gesamtzustandes an oder umgekehrt. In den meisten Fällen von Diskrepanzen zwischen Gesamtscore und Global Assessment Score lag eine Übereinstimmung mit dem Pruritus Score oder dem CADESI, manchmal auch mit der Entwicklung des Medication Scores vor. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass für verschiedene Besitzer und Hunde verschiedene Symptome stärker ins Gewicht fallen. So könnten manche Besitzer den Juckreiz als das gravierendste Symptom ansehen, während andere, deren Hund evtl. schwierig bei der Medikamenteneingabe ist, eine vermehrte Medikamentengabe als Verschlechterung ansehen. In den meisten Fällen stimmte die Einschätzung durch die Besitzer beim Endbesuch jedoch mit dem Gesamtscore überein. Die subjektive Einschätzung durch die Besitzer ist genauso wichtig wie eine objektive

Beurteilung des Krankheitsbildes, da die Besitzer die Therapie durchführen und bezahlen müssen und daher nur bei positiver Einschätzung des Gesamtzustands ihres Hundes die Therapie fortgesetzt wird. Daher ist es sinnvoll, sowohl objektive als auch subjektive Kriterien zu erfassen, und beide zu berücksichtigen. In der s.c. Gruppe betrug der Mittelwert der Global Assessment Scores sowohl beim zweiten als auch beim dritten Besuch rund zwei Punkte, was einer leichten Verbesserung entspricht. Diese Ergebnisse stimmen mit den Gesamtscores überein, die im Mittel vom ersten Besuch bis zum Studienendbesuch absanken. In der oralen Gruppe betrug der Mittelwert beim zweiten Besuch ebenfalls rund zwei Punkte, beim Endbesuch lag er mit rund drei Punkten, was einer zufriedenstellenden Verbesserung entspricht, über dem der s.c. Gruppe. Auch dies stimmt mit den Gesamtscores überein. Sowohl der Gesamtscore als objektives Kriterium als auch der Global Assessment Score als subjektives Kriterium, sprechen für eine bessere Wirksamkeit der IFN-Therapie in der oralen Gruppe.

Auch bei dem Fragebogen zur Lebensqualität des Hundes handelt es sich um eine subjektive Einschätzung durch den Besitzer. Interessanterweise kam es hier zu weitaus größeren Abweichungen der Ergebnisse als bei den Global Assessment Scores. FAVROT und Mitarbeiter (2010b) entwickelten diesen Fragebogen aus Fragen, die von Besitzern und Tierärzten als relevant angesehen wurden und bestätigten eine signifikante Korrelation zwischen den zwei ersten Fragen des Fragebogens, bei denen es sich um Fragen zur generellen Einschätzung der Lebensqualität handelt, und dem CADESI (FAVROT et al., 2010a). Folglich sollte eine Verbesserung der klinischen Daten mit einer Verbesserung der Lebensqualität laut Fragebogen einhergehen. Laut Fragebögen kam es jedoch bei sieben Hunden der oralen Gruppe zu einer Verschlechterung bzw. keiner Änderung der Lebensqualität, obwohl sich der CADESI und der Global Assessment Score bei fünf dieser Hunde verbesserte, und der Gesamtscore sogar bei sechs dieser Hunde eine Verbesserung zeigte. Nur einer der Hunde hatte sich auch laut aller anderen Parameter verschlechtert. In der s.c. Gruppe gab es ebenfalls Diskrepanzen, auch wenn diese im Mittel nicht so gravierend waren. Hier verbesserte sich laut Fragebogen die Lebensqualität von zehn Hunden, während sie sich bei vier verschlechterte, was ungefähr mit der Entwicklung der Gesamtscores in dieser Gruppe übereinstimmt. Leider handelte es sich dabei nicht um dieselben Hunde. Drei der Hunde in der s.c. Gruppe, die sich laut Fragebogen

verschlechterten, verbesserten sich in allen anderen Parametern. Betrachtet man die Mittelwerte, so waren die Änderungen der Lebensqualität im Studienverlauf insgesamt eher gering. Die größeren Diskrepanzen in der oralen Gruppe können evtl. dadurch erklärt werden, dass hier geringfügig mildere Allergiker vertreten waren, bei denen sich die Krankheitssymptome nicht so stark auf die Lebensqualität auswirken. Es wäre möglich, dass nur bei schwereren Allergikern eine Korrelation zwischen den klinischen Daten und den Ergebnissen der Lebensqualitäts-Fragebögen zu erzielen ist. Ob die Beurteilung der Wirksamkeit eines Medikamentes mittels Lebensqualitäts-Fragebögen geschehen sollte, bleibt abzuwarten und in weiteren Studien zu klären. Wenn man davon ausgeht, dass die Krankheitssymptomatik einen Einfluss auf die Lebensqualität hat und die Entwicklung der Krankheitssymptomatik subjektiv durch die Besitzer mittels Global Assessment Score beurteilt wird, so sollte die Entwicklung des Global Assessment Scores mit der der Lebensqualität übereinstimmen. Dies ist hier oft nicht der Fall, der Global Assessment Score stimmt aber insgesamt besser mit den restlichen Beurteilungskriterien (wie z.B. CADESI, Pruritus Score, Gesamtscore) überein. Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint der Global Assessment Score das sinnvollere Beurteilungssystem zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl alle erfassten Parameter wie CADESI, Pruritus Score, Gesamtscore und Global Assessment Score (abgesehen vom Ergebnis der Lebensqualitäts-Fragebögen) als auch die Entwicklung von Pyodermien und begleitenden Therapeutika für eine bessere Effektivität der rFeIFN- $\omega$ -Behandlung in der oralen Gruppe sprechen. Unterschiede im Gruppenaufbau, die die Wirksamkeit der IFN-Therapie beeinflusst haben könnten, sind zum einen die Tatsache, dass in der oralen Gruppe mehr Mischallergiker vertreten waren, und zum anderen die Vermutung, dass in der oralen Gruppe geringfügig mildere Allergiker vertreten waren.

### **1.3. Wirksamkeit der subkutanen Behandlung von CAD mit rFeIFN- $\omega$**

In Gruppe 1 verbesserte sich der Gesamtscore der Patienten im Durchschnitt um 21 %, der CADESI um 36 % und der Pruritus Score um 24 %. Der Gesamtscore stellt das objektivere Ergebnis dar, da klinische Verbesserungen aufgrund von begleitenden Therapien relativiert werden. Insgesamt betrachtet, hatte das rFeIFN- $\omega$  in der s.c. Gruppe also eine eher geringe Effektivität. Bis zum Tag 120 hatten sich sowohl CADESI als auch Pruritus Score bei fünf Patienten um  $\geq 50$  %

verbessert. Dies entspricht 33 % der Studienteilnehmer. Im Gegensatz dazu kam es in der Studie von CARLOTTI und Mitarbeitern (2009) bis Tag 120 bei 50 % der Studienteilnehmer zu einer Verbesserung des Juckreizes von  $\geq 50$  % und bei 61 % zu einer Verbesserung des CADESI um  $\geq 50$  % (CARLOTTI et al., 2009). Bei Studienende hatte sich keiner der erhobenen Parameter der hier vorliegenden Studie signifikant verbessert, während sich in der Studie von CARLOTTI und Mitarbeitern sowohl Pruritus als auch CADESI hochsignifikant ( $P < 0,0001$ ) verbesserten (CARLOTTI et al., 2009). Wie ist dieser bedeutende Unterschied in der Wirksamkeit des Virbagen<sup>®</sup> omega in diesen beiden fast gleich aufgebauten Studien zu erklären?

In CARLOTTI's Studie wurden insgesamt 18 Hunde mit Virbagen<sup>®</sup> omega behandelt, wobei die Dosis und das Intervall der Medikamentenverabreichung exakt mit der hier vorliegenden Studie übereinstimmten. Ihr mittleres Alter betrug 5,4 Jahre. Der mittlere CADESI betrug bei Studienbeginn 161 Punkte, der mittlere Pruritus Score 26. Es handelte sich bei den Studienteilnehmern um rein umweltallergische Hunde, die vor Studienbeginn eine Eliminationsdiät absolvieren mussten. Alle begleitenden Medikamente wurden vor Studienbeginn abgesetzt. Bei Studienbeginn vorliegende Hautinfektionen mit Bakterien oder Hefepilzen wurden vollständig behandelt, bevor der Hund in die Studie eingeschlossen werden konnte. Während der Dauer der Studie war lediglich bei neu entstandenen Pyodermien die orale Verabreichung eines Antibiotikums sowie die Verwendung eines chlorhexidinhaltigen Shampoos erlaubt. Vor Tag 90 durften die Hunde jedoch bei einem Juckreiz-Schub über bis zu sieben Tage Prednisolon in einer Dosierung von 1 mg/kg KGW sid erhalten, was bei sieben Hunden (39 %) geschah, wobei nicht genauer spezifiziert wurde, wie schlimm der Juckreiz-Schub sein musste, um eine Prednisolon-Gabe zu rechtfertigen. Hunde wurden aus der Studie ausgeschlossen, wenn sie z.B. schlimme Malassezieninfektionen hatten, die nicht allein mit Shampoo in den Griff zu bekommen waren oder wenn sie Otitiden entwickelten, die nicht mit EpiOtic-Ohrreiniger allein behandelt werden konnten. Am Tag des Studienausschlusses wurden die klinischen Parameter erhoben und für die Auswertung zu späteren Zeitpunkten weiterverwendet (CARLOTTI et al., 2009).

In der hier vorliegenden Studie lag das mittlere Alter mit 6,6 Jahren nur knapp über dem mittleren Alter bei CARLOTTI's Studie. Der mittlere CADESI lag bei

Studienbeginn mit rund 42 Punkten deutlich unter dem von CARLOTTI und Mitarbeitern. Der Pruritus Score lässt sich zwischen den beiden Studien leider nicht vergleichen, da zwei unterschiedliche Juckreizskalen verwendet wurden. Bei Studienbeginn zeigten zwei Hunde eine generalisierte Hautinfektion, die entsprechend mit Antibiotika- und/oder Shampootherapie behandelt wurde. Wie bereits erwähnt, kann es dadurch zu einer vermeintlich größeren klinischen Verbesserung gekommen sein, als allein durch IFN erzielt worden wäre. Außerdem bekamen fünf Hunde während der Dauer der Studie weiterhin eine bereits begonnene Eliminationsdiät, wovon ein Patient, der die Diät erst kurz vor Studienbeginn angefangen hatte und der im Endeffekt an einer gemischten Umwelt- und Futtermittelallergie litt, profitierte. Hier führte nicht allein Virbagen® omega, sondern auch die Futterumstellung zu einer klinischen Verbesserung. Insgesamt fünf Patienten wurden zusätzlich desensibilisiert. Inwieweit dies zu einer von rFeIFN- $\omega$  unabhängigen klinischen Verbesserung führte und ob diese zwei Therapien sich gegenseitig beeinflussen, ist unbekannt.

All diese Umstände sollten eigentlich zu einer größeren Verbesserung führen als eine Monotherapie mit rFeIFN- $\omega$ , wenn man nur CADESI und Pruritus Score alleine betrachtet, dennoch war die Verbesserung in dieser Studie bei weitem nicht so deutlich wie bei CARLOTTI und Mitarbeitern (2009).

Die Verabreichung von systemisch wirksamen Cortisonpräparaten war während der Dauer dieser Studie nicht erlaubt, und musste nur bei einem Hund aus ethischen Gründen aufgrund von extremem Juckreiz kurz nach dem zweiten Studienbesuch begonnen werden. Lediglich die topische Applikation von cortisonhaltigen Cremes und Sprays war in dieser Studie erlaubt. Glukokortikoide sind neben Cyclosporin die wirksamsten Medikamente zur Behandlung der CAD (OLIVRY et al., 2010a), da sie den Juckreiz und die Entzündungsreaktion der Haut stark eindämmen und somit sekundär auch zu einer deutlichen Verbesserung des Hautbildes führen. Eine systemische Verabreichung von Prednisolon in der entzündungshemmenden Dosierung von 1 mg/kg KGW sid kann somit zu einer deutlichen Reduktion der Punktzahlen sowohl von CADESI als auch von Pruritus Score führen, wobei die systemische Verabreichung im Gegensatz zur lokalen zu höheren Wirkspiegeln und einer generalisierten Wirkung führt. Somit könnte die Tatsache, dass in der hier vorliegenden Studie nur ein Hund von 15 (7 %), in der Studie von CARLOTTI und Mitarbeitern aber sieben von 18 Hunden (39 %)

während der Studie mit systemischen Glukokortikoiden behandelt wurden, zu der scheinbar besseren Effektivität von Virbagen® omega in der Studie von CARLOTTI und Mitarbeitern beigetragen haben.

Auch fand in der hier vorliegenden Studie kein Studienausschluss aufgrund von schlimmen Otitiden oder dergleichen statt, sodass eine durch Otitis bedingte Verschlechterung des Juckreizes mit in die Auswertung einging.

In dieser Studie litten drei Patienten an einer gemischten Allergie, die sowohl gegen Umweltallergene als auch gegen Futtermittelallergene gerichtet war. Wie bereits erwähnt, wurde die Wirkung von IFN auf futtermittelinduzierte CAD noch nicht in Studien erforscht.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Studien besteht in der Art der Lagerung des rekonstituierten Virbagen® omega. Während das Medikament in der Studie von CARLOTTI und Mitarbeitern (2009) direkt nach Rekonstitution portioniert und eingefroren wurde, wurde das Medikament in der hier vorliegenden Studie nach Rekonstitution bis zu maximal drei Wochen bei 4°C aufbewahrt. Laut Angaben der Firma Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland, ist die Stabilität des Medikamentes sowohl bei 4°C über 3 - 4 Wochen als auch nach Einfrieren über einen längeren Zeitraum konstant, was in unveröffentlichten Studien bestätigt wurde. Somit sollte die unterschiedliche Lagerung keinen Einfluss auf die Aktivität und Wirkung des IFN haben, es wurden jedoch in der hier vorliegenden Studie keine Untersuchungen durchgeführt, inwiefern nach drei Wochen tatsächlich noch dieselbe Menge an aktivem IFN in dem Medikament enthalten war.

Da dies erst die zweite Studie ist, die sich mit der Behandlung der CAD mittels rFeIFN- $\omega$  in dieser Dosierung und diesem Dosierungsintervall beschäftigt, ist es gut möglich, dass das Ergebnis von CARLOTTI und Mitarbeitern (oder unser Ergebnis hier) nicht den realen Gegebenheiten entspricht, sondern auf Zufall zurückzuführen ist.

Interessanterweise gibt es zwischen den verschiedenen Studien in der Humanmedizin, die sich mit der Therapie der AD mittels Typ I IFN beschäftigen, ebenfalls große Schwankungen zwischen den Ergebnissen (MACKIE, 1990; KIMATA et al., 1995; NOH & LEE, 2001). Während in manchen Studien gute Erfolge erzielt werden konnten, war die Behandlung in anderen Studien so gut



wie wirkungslos. Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten, wie im Literaturteil bereits erwähnt, das unterschiedliche Alter der Patienten, die Art der Ausprägung der Allergie, Art und Dosierung des IFN und unterschiedliche immunologische Ausgangslagen z.B. aufgrund anderer zusätzlicher Erkrankungen sein.

Es ist z.B. auch bekannt, dass das Vorhandensein unterschiedlicher Zytokine bei der Bindung des IFN an seinen Rezeptor die resultierende Reaktion der Zelle beeinflussen kann (VAN BOXEL-DEZAIRE et al., 2006; BORDEN et al., 2007). Inwiefern die immunologische Ausgangslage zwischen den individuellen Hunden variiert lässt sich jedoch nicht bestimmen. So können subklinische Infektionen oder begleitende Erkrankungen die Ausgangslage im Immunsystem ändern und somit eventuell zu einer veränderten Reaktion auf IFN führen. Bei einem der Patienten wurde einige Zeit nach Studienende ein metastasierendes Adenokarzinom der Prostata diagnostiziert. Der Gesamtscore dieses Patienten hatte sich bis zum Studienende verschlechtert. Ob die Neoplasie die Zytokinexpression und somit die Ausgangslage des Immunsystems so veränderte, dass das injizierte IFN nicht mehr wirken konnte, ist ungeklärt.

Betrachtet man die fünf Hunde, deren Gesamtscore beim Endbesuch genauso hoch oder höher war als beim Erstbesuch, die also nicht auf die IFN-Therapie ansprachen, so fällt auf, dass das mittlere Alter mit rund 9,2 Jahren deutlich über dem Durchschnitt der Hunde liegt, die sich verbessert hatten (rund 5,3 Jahre). Dieser Unterschied war bei der Auswertung mittels ungepaartem T-Test in der s.c. Gruppe statistisch signifikant ( $P = 0,0299$ ). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass jüngere Hunde, die meist auch noch nicht so lange an CAD leiden, besser auf eine Therapie mit IFN ansprechen, als ältere Tiere. Das könnte bedeuten, dass die Chronizität der Erkrankung eine Rolle spielt, da Hunde, die länger an CAD leiden, dazu neigen, mehr chronische Läsionen auszubilden. Da, wie im Pathogeneseteil der Literaturübersicht beschrieben, in chronischen Läsionen wahrscheinlich ein Wechsel von einer Th2-dominierten Immunantwort zu einer Th1-dominierten stattfindet, ist es möglich, dass IFN in chronischen Läsionen nicht mehr gut wirken kann, da der postulierte Wirkungsmechanismus der einer Verschiebung der Th2- in Richtung einer Th1-Immunantwort ist.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Effektivität von subkutan verabreichtem rFeIFN- $\omega$  in dieser Studie nicht mit der in der Studie von CARLOTTI und

Mitarbeitern (2009) erzielten übereinstimmt. Dies deckt sich jedoch mit den unterschiedlichen Ergebnissen, die in der Humanmedizin bei der Therapie der AD mit Typ I IFN erzielt wurden. Um weitere Einblicke zu erhalten, welche Mechanismen diesen unterschiedlichen Erfolgen zugrunde liegen und um die tatsächliche Effektivität der subkutanen Behandlung der CAD mit rFeIFN- $\omega$  zu bestimmen, sind weitere Studien nötig, die größere Fallzahlen untersuchen und doppelt-verblindet sind.

#### **1.4. Wirksamkeit der oralen Behandlung von CAD mit rFeIFN- $\omega$**

In Gruppe 2 verbesserte sich der Gesamtscore im Durchschnitt um 36 %, der CADESI um 61 % und der Juckreiz um 34 %. Sowohl die Verbesserung des CADESI als auch die Verbesserung des Gesamtscores ist statistisch signifikant mit einem P-Wert von 0,0414 bzw. 0,019. Auch in der oralen Gruppe verbesserten sich CADESI und Juckreiz bei je fünf Patienten um  $\geq 50$  %, da in der oralen Gruppe jedoch nur elf Patienten waren, entspricht dies 45 % der Hunde, also fast der Hälfte. Da sich in Gruppe 2 nur ein Hund verschlechterte, ist eine statistische Auswertung des Alters der Patienten, die sich verbesserten bzw. verschlechterten, nicht sinnvoll.

Zur oralen Behandlung der CAD liegen noch keine Berichte in der Literatur vor, somit gibt es keine Vergleichswerte. Das Ergebnis dieser Pilotdaten ist jedoch sehr vielversprechend. Warum die orale IFN-Therapie hier eine größere Wirksamkeit aufweist als die subkutane, ist noch ungeklärt. Zwei Theorien wurden bereits angesprochen, nämlich die, dass in der oralen Gruppe mildere Allergiker vertreten waren, bei denen die IFN-Therapie evtl. besser wirkt, und die, dass in der oralen Gruppe mehr Hunde mit gemischter, sowohl durch Umweltallergene als auch durch Futtermittelallergene ausgelöster CAD waren, bei denen die orale IFN-Therapie evtl. einen besseren Effekt hat.

In der oralen Gruppe wurde im Gegensatz zur s.c. Gruppe das IFN täglich verabreicht. Diese höhere Frequenz könnte ebenfalls für die bessere Wirksamkeit mit verantwortlich sein. Die Dosis und das Intervall der Verabreichung, mit denen die besten Wirkungen erzielt werden können, sollten sowohl in der oralen als auch in der s.c. Gruppe durch weitere Studien ermittelt werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass die orale IFN-Therapie der subkutanen IFN-Therapie aufgrund des unterschiedlichen Wirkungsmechanismus bei der

Behandlung der CAD überlegen ist. Es wurde bereits beschrieben, dass (markiertes) IFN nach oraler Verabreichung nicht im Blutkreislauf nachgewiesen werden konnte (WILLS et al., 1984; GIBSON et al., 1985; EID et al., 1999), wohl aber ein Anstieg der 2'5'-Oligoadenylat Synthetase, einem Enzym, das speziell durch IFN induziert wird (SATO et al., 1999; NAKAJIMA & SOKAWA, 2002). Dadurch ist die Wirkungsweise des oral verabreichten IFN definitiv eine andere als die des subkutan oder intravenös verabreichten IFN, das im Organismus selbst wirken kann. Wahrscheinlich wirkt orales IFN immunmodulierend durch den sogenannten "Priming-Effekt", indem es Zellen des lokalen lymphatischen Gewebes dazu anregt, selbst Enzyme und IFN zu produzieren, welche entsprechend systemische Wirkungen ausüben können (ISAACS et al., 1958; LOCKART, 1963; TOMPKINS, 1999). Evtl. überwiegt nach oraler Verabreichung also der immunmodulatorische Effekt (SCHELLEKENS et al., 2001; HARTMANN, 2005), im Gegensatz zu den sowohl immunmodulatorischen als auch antiproliferativen und antiviralen Effekten nach subkutaner Verabreichung. In verschiedenen Studien wurden zwar nach oraler Verabreichung bei entsprechenden Krankheiten auch sowohl immunmodulierende als auch antivirale und antitumorale Wirkungen nachgewiesen, es scheint jedoch so, dass die antivirale und antitumorale Wirkung nach oraler IFN-Therapie durch eine Immunmodulation erreicht wird, da die Zeit, die bis zum Eintreten der antiviralen Wirkung nach oraler Verabreichung vergeht, deutlich länger ist als nach subkutaner Verabreichung (SCHELLEKENS et al., 2001). Interessanterweise entspricht die Dosis IFN, die bei oraler IFN-Therapie die beste Wirkung erzielt, ungefähr der Konzentration an IFN, wie sie auch bei Menschen und Tieren, die an respiratorischen Erkrankungen litten, in der Nasen-, Maul- und Rachenschleimhaut nachgewiesen werden konnte (TODD et al., 1972; DOUGLAS & BETTS, 1974; MCINTOSH, 1978; SAVAN et al., 1979; CUMMINS et al., 1999). Zusammengefasst könnte dies also bedeuten, dass durch die orale IFN-Therapie eine "physiologischere" Immunantwort stattfindet als durch die parenterale IFN-Therapie, und es somit bei der Behandlung der CAD zu einem gezielteren immunmodulatorischem Effekt kommt, wodurch sich die bessere Wirksamkeit der oralen IFN-Therapie erklären lässt (CUMMINS et al., 1999).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass die bessere Wirkung der oralen IFN-Therapie

der CAD in dieser Studie eventuell durch die Patienten selbst bedingt ist, da z.B. in der oralen Gruppe mehr Mischallergiker waren, die insgesamt an einer milderen Allergie zu leiden schienen, oder durch das Dosierungsintervall, oder aber auf einer anderen Wirkungsweise des oral verabreichten IFN im Gegensatz zu parenteral verabreichtem IFN basiert. Auch hier sind für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen und auch zur Bestätigung der Ergebnisse weitere Studien nötig.

## **2. Bildung von Antikörpern gegen rFeIFN- $\omega$ bei Hunden mit CAD**

Um zu überprüfen, ob die Hunde im Verlauf der Studie Antikörper gegen rFeIFN- $\omega$  entwickelten, wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Da das in dieser Studie verwendete Verabreichungsintervall von Virbagen<sup>®</sup> omega entfernt an ein Impfschema erinnert, bei dem initial Immunglobulin M (IgM), anschließend an die akute Phase jedoch nach ca. drei Wochen Immunglobulin G (IgG) gebildet wird, welches lange erhalten bleibt und auch zur Überprüfung einer erfolgreichen Impfung gemessen wird, wurde als Zweitantikörper in diesem ELISA ein polyklonaler Antikörper, der gegen canines IgG gerichtet ist, verwendet. Auch in vorangegangenen Studien, in denen Tiere subkutan mit speziesfremdem IFN behandelt wurden, wurden anti-IFN-Antikörper der Klasse IgG nachgewiesen (ZEIDNER et al., 1990; CAVE et al., 2004).

Es handelte sich bei dem hier durchgeführten ELISA um einen rein qualitativen Nachweis, eine quantitative Titer-Bestimmung war aufgrund des Fehlens eines kommerziell erwerblichen Antikörpers gegen rFeIFN- $\omega$  nicht möglich. Auch hätte ein positiver Antikörpernachweis noch keinen Aufschluss darüber gegeben, ob es sich tatsächlich um neutralisierende Antikörper handelt, die rFeIFN- $\omega$  unwirksam machen. Dies hätte durch weitere Labordiagnostik nachgewiesen werden müssen.

Vor der Behandlung der Hunde mit Virbagen<sup>®</sup> omega im Rahmen der Studie war keiner der Hunde mit Virbagen<sup>®</sup> omega behandelt worden, sodass theoretisch keine Antikörper gegen dieses Medikament vorhanden sein konnten. Es wurde also angenommen, dass die erste Serumprobe negativ sein würde, d.h., dass keine oder nur eine sehr niedrige Extinktion gemessen werden würde. Bei einer Bildung von Antikörpern gegen rFeIFN- $\omega$  während der Studie, wäre mit einer höheren Extinktion in der zweiten, bei Studienende entnommenen, Serumprobe zu

rechnen, während bei ausbleibender Antikörperbildung die Extinktion der zweiten Serumprobe der ersten Serumprobe entsprechen würde.

In der oralen Gruppe wurde nicht mit der Bildung von Antikörpern gerechnet, da in früheren Studien, wie bereits erwähnt, nach oraler IFN-Verabreichung kein IFN im Blutkreislauf nachzuweisen war, da IFN als Protein verdaut wird (CANTELL & PYHALA, 1973; WILLS et al., 1984; GIBSON et al., 1985; EID et al., 1999). Folglich ist kein Antigen im Organismus präsent, gegen das eine Antikörperbildung stattfinden könnte. Auch in der Literatur wurde bislang noch nicht von einer Antikörperbildung nach oraler Verabreichung von speziesfremdem IFN berichtet (BEILHARZ et al., 1997; EID et al., 1999; GILGER et al., 1999; SATOH et al., 1999; TOVEY & MAURY, 1999; NAKAJIMA & SOKAWA, 2002; HARTMANN, 2005). Zusätzlich sind die Mengen, die oral verabreicht wurden, so gering (Virbagen® omega wurde für die orale Verabreichung 1/2000 verdünnt), dass es unwahrscheinlich ist, dass hier eine ausreichende Menge Protein enthalten war, um eine Antikörperbildung zu induzieren. Im Gegensatz dazu wurde in der s.c. Gruppe aufgrund der bisherigen Erfahrungen, die in der Literatur zu finden sind, mit einer Antikörperbildung gerechnet (ZEIDNER et al., 1990; CAVE et al., 2004).

Bei der Auswertung des ELISA fiel als erstes auf, dass bereits in den ersten Serumproben, die an Tag 0 entnommen wurden, bei allen Hunden eine signifikant höhere Extinktion gemessen wurde als in der Negativkontrolle. Dies bedeutet, dass der enzymmarkierte Zweitantikörper, der gegen canines IgG gerichtet ist, gebunden hat, wobei unklar ist, woran, da wie bereits erwähnt in der ersten Serumprobe noch keine Antikörper enthalten sein dürften. In der Negativkontrolle wurden jedoch, wie erwartet, mit nur drei Ausnahmen sehr niedrige Extinktionen gemessen, was für eine erfolgreiche Blockierung spricht. Es wäre aber trotz erfolgreicher Blockierung möglich, dass BSA für diesen speziellen ELISA mit Virbagen® omega als Antigen, als Blockierer nicht geeignet ist. Um einen geeigneten Blockierer für diesen ELISA zu eruieren, wurde vor Studienbeginn ein Testlauf durchgeführt, in dem 0,5 % Gelatine in PBS als Blockierer mit 3 % BSA in PBS verglichen wurde. Hier zeigte die Blockierung mit 3 % BSA in PBS deutlich weniger Hintergrund-"Rauschen" als 0,5 % Gelatine in PBS. Ob bessere Ergebnisse mit einem dritten, z.B. Casein-basierenden Blockierer erzielt werden könnten, wurde nicht getestet.

Eine weitere mögliche Ursache für die hohen gemessenen Extinktionen schon in der ersten Serumprobe könnte der Umstand sein, dass, in Ermangelung von rFeIFN- $\omega$  in reiner Form, das Medikament Virbagen<sup>®</sup> omega als Antigen zur Beschichtung der ELISA-Platten verwendet wurde. Das Lyophilisat von Virbagen<sup>®</sup> omega enthält laut Packungsbeilage neben rFeIFN- $\omega$  Gelatine von porciner Herkunft. Dies wurde durch die Auftrennung der in dem Medikament enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE und anschließende Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie bestätigt. Andere Proteine konnten nicht nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass es beim Menschen zu einer Bildung von Antikörpern der Klassen IgE und IgG gegen in Impfstoffen enthaltene Gelatine kommen kann (MIYAZAWA et al., 1999). Da im Lyophilisat mancher Impfstoffe für Hunde ebenfalls Gelatine enthalten ist, könnte der unterschiedliche Ausgangswert der Extinktionen der Hunde evtl. durch das Vorliegen präformierter anti-Gelatine-Antikörper bedingt sein, die sich nach vorangegangenen Impfungen gebildet haben. Ebenso denkbar ist, dass die im Virbagen<sup>®</sup> omega enthaltene Gelatine oder auch das rFeIFN- $\omega$  selbst zu Kreuzreaktionen und unspezifischen Bindungen mit Serumbestandteilen und Antikörpern bzw. dem verwendeten Zweitantikörper geführt haben, was die hohe Extinktion erklären würde. Kreuzreaktionen und unspezifische Bindungen sind ein bekanntes Phänomen bei ELISAs, die die Auswertung teilweise ziemlich erschweren können (MICHALSKI et al., 1996; WICHMANN et al., 2006; VAN VUREN & PAWESKA, 2010; REIDY et al., 2011).

Die Durchführung eines "Sandwich"-ELISA, durch den das Problem der im Virbagen<sup>®</sup> omega zusätzlich enthaltenen Gelatine gelöst wäre, war in Ermangelung eines Antikörpers gegen rFeIFN- $\omega$  nicht möglich.

Beim Vergleich der Extinktionen aller Serumproben von Tag 0 mit allen Serumproben von Tag 120 war in beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen. Dies spricht dagegen, dass sich im Studienverlauf Antikörper gegen rFeIFN- $\omega$  oder einen anderen Bestandteil von Virbagen<sup>®</sup> omega gebildet haben, da dies zu einem signifikanten Anstieg der Extinktion hätte führen müssen.

Aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten (kein rFeIFN- $\omega$  in Reinform und kein anti-rFeIFN- $\omega$ -Antikörper) war der Aufbau des hier verwendeten ELISAs nicht optimal. Das insgesamt hohe Hintergrund-"Rauschen" in diesem ELISA (die

hohen Extinktionen schon in der ersten Probe) kann zu einer Verfälschung des Ergebnisses geführt haben. So könnte ein geringgradiger Titeranstieg aufgrund von Antikörperbildung gegen rFeIFN- $\omega$  durch das Hintergrund-"Rauschen" überdeckt worden sein. Auch das Fehlen eines spezifischen Antikörpers gegen rFeIFN- $\omega$  und damit das Fehlen einer Positivkontrolle erschweren die Auswertung dieses ELISAs. Somit lässt sich nur sagen, dass die Ergebnisse momentan, mit den eingeschränkten diagnostischen Möglichkeiten, darauf hindeuten, dass bei Hunden keine Antikörperbildung gegen einen der Bestandteile des Medikamentes Virbagen® omega stattfindet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei einer zukünftigen Anwendung eines anderen, spezifischeren ELISA-Aufbaus, mit Verwendung von rFeIFN- $\omega$  in Reinform bzw. mit einem Antikörper gegen rFeIFN- $\omega$  als Positivkontrolle und zur Erstellung einer Verdünnungsreihe, evtl. andere Ergebnisse erzielt werden.

Warum es bei manchen Tieren zu einem geringgradigen Extinktionsanstieg oder auch einem Absinken der Extinktion in der zweiten Serumprobe kam, ist unklar. Eventuell hatte der Gesamtproteingehalt bzw. der gesamt-Immunglobulin-Gehalt des Serums Einfluss auf die Extinktion. Zum Beispiel könnte es infolge eines infektiösen Geschehens zu einem Anstieg bzw. nach Abklingen einer Infektion zu einem Abfall an Immunglobulinen gekommen sein und somit traten mehr oder weniger Kreuzreaktionen, unspezifische Bindungen und Matrixeffekte auf. Dies würde erklären, wieso es bei manchen Hunden zu einem geringgradigen Anstieg und bei anderen zu einem geringgradigen Absinken der Extinktion kam. Es lagen aber nur bei wenigen Hunden offensichtliche Umstände wie z.B. schlimme Pyodermien oder die Sepsis vor, die diese Annahme bestätigen könnten. Interessanterweise sieht man in der s.c.-Gruppe, in der es im Mittel zu einem Absinken der Extinktion kam, ebenfalls ein Absinken der mittleren Extinktion der Negativkontrolle (siehe Abbildung 7). Umgekehrt sieht man in der oralen Gruppe, in der die Extinktion im Mittel geringgradig anstieg, auch einen geringgradigen Anstieg der Extinktion der Negativkontrolle (siehe Abbildung 8), was für diese Theorie sprechen könnte. Auch eine Änderung in der Proteinzusammensetzung des Serums könnte eine erhöhte oder erniedrigte Kreuzreaktivität bzw. unspezifische Bindung auslösen (MICHALSKI et al., 1996).

Ob ein Protein in der Lage ist, nach Applikation eine Antikörperbildung bei einem bestimmten Individuum auszulösen, ist von verschiedenen Faktoren abhängig

(PATHAK & PALAN, 2005). Zum einen muss das Protein "fremd" sein und vom Organismus als "fremd" erkannt werden (PATHAK & PALAN, 2005). Ähnelt das applizierte Protein einem körpereigenen Protein, so wird es nicht als "fremd" erkannt und es werden keine Antikörper gebildet. Dies könnte z.B. der Fall sein, wenn das feline IFN- $\omega$  dem des Hundes sehr ähnelt. Bei einer durchgeführten Literaturrecherche wurden keine Informationen zum Aufbau des caninen IFN- $\omega$  gefunden. Somit kann über eine eventuelle Ähnlichkeit der beiden Proteine keine Aussage getroffen werden. Desweiteren muss das Protein eine gewisse Größe haben um immunogen zu sein (PATHAK & PALAN, 2005). Eine direkt nach der Gewinnung und Reinigung des in Seidenspinnerräupen hergestellten rFeIFN- $\omega$  durchgeführte SDS-PAGE zeigte, dass rFeIFN- $\omega$  eine einzige Proteinbande bildete, mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa (UEDA et al., 1993). Auch die in dieser Studie durchgeführte SDS-PAGE mit anschließender Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie zeigte, dass das feline IFN eine einzelne Proteinbande bei ca. 25 kDa bildet. Mit diesem Molekulargewicht sollte rFeIFN- $\omega$  eine ausreichende Größe besitzen, um eine Antikörperbildung auszulösen. Humanes IFN- $\alpha$ 2b, das nach subkutaner Applikation bei Katzen zur Bildung neutralisierender Antikörper führte (ZEIDNER et al., 1990), hat ein Molekulargewicht von ungefähr 20 kDa (LOIGNON et al., 2008). Auch die Art der Applikation kann einen Einfluss auf die Bildung von Antikörpern haben. Wie bereits erwähnt, hat die subkutane Applikation mehr Potential zur Auslösung einer Antikörperbildung als eine orale Applikation, da es nach oraler Applikation wahrscheinlich ist, dass das Protein, bevor es in Kontakt mit einer Antigen-präsentierenden-Zelle kommt, verdaut wird (PATHAK & PALAN, 2005). Neben dem Applikationsort ist auch die applizierte Menge entscheidend für die Reaktion des Immunsystems. So können zu geringe Mengen, aber auch sehr hohe Mengen eine Antikörperproduktion hemmen (PATHAK & PALAN, 2005). Im Vergleich zu der Dosierung, die auf dem Beipackzettel von Virbagen<sup>®</sup> omega für Hunde mit Parvovirose angegeben ist (2,5 Millionen I.E./kg KGW sid), wurden in dieser Studie sehr geringe Mengen appliziert. In der oralen Gruppe wurde sogar noch weniger rFeIFN- $\omega$  verabreicht. In der Studie von ZEIDNER und Mitarbeitern (1990) war die Bildung neutralisierender Antikörper eindeutig dosisabhängig. Katzen, die eine Dosis von  $10^6$  I.E./kg KGW erhielten entwickelten schneller höhere Titer, sodass die Katzen nach drei Wochen therapieresistent waren, während die Entwicklung vergleichbarer Titer bei Katzen, die eine Dosis von  $10^5$



I.E./kg KGW erhielten, etwa doppelt so lang dauerte und diese erst nach sieben Wochen therapieresistent wurden (ZEIDNER et al., 1990). Zusätzlich zu bemerken ist, dass die Katzen täglich subkutan behandelt wurden. In der hier vorliegenden Studie entsprach die Dosis in der s.c. Gruppe etwa den  $10^5$  I.E./kg KGW (ein Hund mit 10 kg KGW bekam eine Millionen I.E., was  $10^5$  I.E. entspricht), die Injektionen erfolgten jedoch nicht täglich, sondern nur achtmal innerhalb von vier Monaten. Es ist also durchaus möglich, dass diese Dosis nicht ausreichte, um eine Antikörperbildung bis Studienende zu induzieren. Ob bei Verabreichung höherer Dosen und/oder bei häufigerer Applikation eine Antikörperbildung stattfinden würde, müsste in weiteren Studien untersucht werden, wäre allerdings nur relevant, wenn damit auch eine bessere Wirkung erzielt werden könnte. Doch nicht nur die Immunogenität des Proteins hat einen Einfluss darauf, ob es zu einer Antikörperbildung kommt, auch das Individuum kann einen Einfluss auf die Antikörperproduktion haben. So kann ein Immunogen in einem Individuum eine Antikörperproduktion hervorrufen, in einem anderen jedoch nicht. Dies liegt an den unterschiedlichen genetischen Voraussetzungen. Für die Antigenpräsentation und damit die Antikörperproduktion sind major-histocompatibility-complex (MHC)-Moleküle und natürlich auch T-Helfer-Zellen und B-Lymphozyten von großer Bedeutung. Individuelle Unterschiede diese Moleküle und Zellen betreffend können zu unterschiedlicher Antikörperproduktion führen (PATHAK & PALAN, 2005). Somit wäre es theoretisch möglich, dass bei Hunden mit CAD, bei denen die Immunantwort beeinträchtigt ist, die Bildung von IgG ausbleibt, während sie bei gesunden Hunden stattfinden würde. Nicht auszuschließen ist auch die Bildung von Antikörpern anderer Klassen, da hier nur IgG nachgewiesen wurde. Ebenso wäre es möglich, dass individuelle Unterschiede dazu führen könnten, dass manche Hunde Antikörper gegen rFeIFN- $\omega$  oder auch gegen porcine Gelatine bilden, andere jedoch nicht. In dem hier vorliegenden ELISA spricht das Ergebnis zwar insgesamt gegen eine Antikörperbildung, und auch bei Betrachtung der einzelnen Tiere fällt die Extinktion meist ab oder ändert sich kaum, bei wenigen Hunden kam es aber zu einem recht deutlichen Extinktionsanstieg. Bei jeweils drei Hunden in der s.c. und in der oralen Gruppe stieg die Extinktion um einen Wert von 0,1 oder mehr. Es ist also nicht auszuschließen, dass hier eine Antikörperbildung gegen einen der Bestandteile von Virbagen® omega stattfand. Aus oben genannten Gründen wird eine Antikörperbildung in der oralen Gruppe

jedoch als höchst unwahrscheinlich angesehen, und da die Extinktionen anderer Tiere teilweise ebenso deutlich absanken, wird hier eher von einer Schwankung der Extinktion aus oben erwähnten anderen Gründen ausgegangen.

Abgesehen von den bereits genannten Gründen, die evtl. zum Ausbleiben einer Antikörperproduktion geführt haben könnten, besteht die Möglichkeit, dass das rFeIFN- $\omega$  innerhalb der drei Wochen, in denen es nach Rekonstitution, und in der oralen Gruppe nach Verdünnung, bei Kühlschranktemperaturen aufbewahrt wurde, Degradierungsprozessen unterlag. Wie bereits erwähnt, wurde die Stabilität des Proteins nach Rekonstitution und nach Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung über drei bis vier Wochen bei 4°C durch Mitarbeiter der Firma Virbac, Bad Oldesloe, Deutschland, bestätigt, wurde aber im Rahmen dieser Studie nicht überprüft. Besonders in der oralen Gruppe, in der das Medikament sehr stark verdünnt wurde und nicht in den ursprünglichen Glasampullen, sondern in Infusionsflaschen aus Polyethylen aufbewahrt wurde, ist es möglich, dass die Tertiär- bzw. Sekundärstruktur des rFeIFN- $\omega$  verloren ging, dass es zur Bildung von Aggregaten kam oder dass eine Adsorption an die Gefäßwand stattfand (SHARMA & KALONIA, 2003; RUIZ et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Ergebnisse des indirekten ELISA dafür sprechen, dass das hier verwendete Therapieprotokoll weder in der s.c. Gruppe noch in der oralen Gruppe zu einer Antikörperbildung gegen rFeIFN- $\omega$  oder einen anderen Bestandteil von Virbagen<sup>®</sup> omega führte. Gründe für eine ausbleibende Antikörperbildung könnten sein, dass das rFeIFN- $\omega$  große Homologien zu caninem IFN aufweist, dass die applizierte Menge zu gering bzw. die Abstände zwischen den Applikationen zu groß waren, um eine Antikörperproduktion zu induzieren, oder, im Fall der oralen Gruppe, dass die Art der Applikation eine Antikörperbildung nicht zuließ. Desweiteren ist es möglich, dass die veränderte Immunantwort bei Allergikern die Antikörperbildung generell beeinträchtigt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist sowohl die subkutane als auch die orale Therapie mit rFeIFN- $\omega$  bei Hunden mit CAD möglich, wobei die Ergebnisse dieser Studie auf eine bessere Wirksamkeit der oralen rFeIFN- $\omega$  Therapie hindeuten. Die Effektivität der oralen Verabreichung sollte in randomisierten und kontrollierten Studien bestätigt werden.

## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

### **Therapie der caninen atopischen Dermatitis mit rekombinantem felinem Interferon- $\omega$ : Evaluierung der Bildung neutralisierender Antikörper und Vergleich der Wirksamkeit der oralen und subkutanen Verabreichung.**

Bei der Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis (CAD), einer allergischen Hauterkrankung des Hundes, spielen neben genetischen Faktoren und Umweltfaktoren vor allem Veränderungen des Immunsystems eine große Rolle. Bei allergischen Hunden überwiegt die Antwort der T-2-Helferzellen (Th2), die zu einem erhöhten Interleukin (IL)-4/Interferon (IFN)- $\gamma$ -Quotienten und der überschießenden Bildung von Antikörpern der Klasse Immunglobulin E (IgE) führt. IgE spielt eine bedeutende Rolle bei der gesteigerten Antigenpräsentation und bei der Mastzelldegranulation, und trägt somit zur Entstehung der typischen entzündlichen und juckenden Hautveränderungen bei. Momentan bestehen die therapeutischen Möglichkeiten aus einer Kombination von symptomatischen Medikamenten und der allergen-spezifischen Immuntherapie (ASIT), welche die einzig verfügbare ursächliche Therapie darstellt. IFN sind als natürlich vorkommende Botenstoffe im Körper dazu in der Lage, die Th2-Immunantwort zu unterdrücken. Die therapeutische Wirksamkeit von rekombinantem felinem IFN- $\omega$  (rFeIFN- $\omega$ ) zur subkutanen (s.c.) Behandlung der CAD wurde bereits experimentell bestätigt. Die Effektivität der oralen rFeIFN- $\omega$  Therapie der CAD wurde noch nicht untersucht.

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob die Langzeittherapie von atopischen Hunden mit rFeIFN- $\omega$  zur Bildung neutralisierender Antikörper führt. Zusätzlich sollte die Wirksamkeit der oralen und der subkutanen rFeIFN- $\omega$ -Therapie der CAD verglichen werden.

Die Studie war als randomisierte, offene Feldstudie angelegt. Die Studiendauer betrug vier Monate. 26 Hunde, die an CAD litten, wurden mit Hilfe einer Randomisierungstafel auf zwei Gruppen aufgeteilt. Beide Gruppen wurden mit rFeIFN- $\omega$  (Virbagen<sup>®</sup> omega, Virbac, Carros, Frankreich) behandelt. Die erste Gruppe (n = 15) erhielt das Medikament insgesamt achtmal subkutan, die zweite Gruppe (n = 11) wurde täglich oral behandelt. Zusätzliche Medikamente,

abgesehen von systemisch verabreichten Glukokortikoiden und Cyclosporin, die zwei Wochen vor Studienbeginn abgesetzt werden mussten, waren erlaubt. Während der vier Monate durften die Hunde nicht geimpft werden. Hunde, die an Morbus Cushing litten, waren von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen. Für den Antikörpernachweis wurde bei Studienbeginn und -ende eine venöse Blutprobe entnommen. Bei Studienbeginn, nach zwei und nach vier Monaten fanden Kontrollbesuche statt. Dabei beurteilte der Tierarzt das Hautbild des Hundes anhand eines validierten Läsionenscores (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index = CADESI). Die Besitzer beurteilten den Juckreiz ihres Hundes anhand einer validierten Juckreizskala. Begleitende Therapien wurden auf einem Medication Score dokumentiert. Aus den Werten von CADESI, Juckreizskala und Medication Score wurde für jeden Besuch ein Gesamtscore erstellt. Für die Antikörperbestimmung wurde ein indirekter ELISA durchgeführt, als Antigen zur Beschichtung der ELISA-Platten wurde Virbagen® omega verwendet.

Beide Gruppen zeigten bei Studienende eine Verbesserung von CADESI, Juckreiz und Gesamtscore, allerdings waren diese Verbesserungen nur in der oralen Gruppe beim CADESI (61 %,  $P = 0,0414$ ) und Gesamtscore (36 %,  $P = 0,019$ ) statistisch signifikant. Der Antikörpernachweis mittels ELISA zeigte beim Vergleich der Extinktionen der Serumproben von Tag 0 und Tag 120 weder in der s.c. noch in der oralen Gruppe einen signifikanten Unterschied (Mittelwerte der s.c. Gruppe 0.367 und 0.331,  $P = 0,33$  und der oralen Gruppe 0.393 und 0.415,  $P = 0,68$ ). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Antikörperbildung.

Folglich ist die Langzeittherapie sowohl mit subkutanem als auch mit oralem rFeIFN- $\omega$  möglich, die Ergebnisse dieser Studie sprechen jedoch für eine bessere Wirksamkeit der oralen Verabreichung. Die Effektivität der oralen Verabreichung sollte in größeren, randomisierten und kontrollierten Studien bestätigt werden.

## VII. SUMMARY

### **Treatment of canine atopic dermatitis with recombinant feline interferon- $\omega$ : evaluation of neutralizing antibody development and comparison of the efficacy of oral and subcutaneous administration.**

Apart from genetic and environmental factors, immunologic factors play an important role in the pathogenesis of canine atopic dermatitis (CAD), an allergic skin disease in the dog. In allergic dogs there is an increased T-2-helper cell (Th2) response, which leads to an elevated interleukin (IL)-4/interferon (IFN)- $\gamma$ -ratio and the excessive production of antibodies of the immunoglobulin E (IgE) type. IgE plays an important part in antigen presentation, which is elevated in dogs with CAD, and in mast cell degranulation. Therefore IgE contributes to the development of the typical inflammatory and pruritic skin lesions in CAD. Current therapeutic possibilities include a combination of symptomatic treatments and allergen-specific immunotherapy (ASIT), the latter is the only specific therapy available. IFNs are naturally occurring messengers in the body that are able to suppress the Th2 response. The therapeutic efficacy of recombinant feline IFN- $\omega$  (rFeIFN- $\omega$ ) as a subcutaneous (s.c.) treatment of CAD has been proven experimentally. The efficacy of orally administered rFeIFN- $\omega$  as treatment of CAD has not been tested yet.

The aim of this study was, to determine whether atopic dogs develop antibodies against rFeIFN- $\omega$  during long-term therapy and to compare the efficacy of oral and subcutaneous administration.

This study was planned as a randomized open field study. The duration of the study was four months. 26 atopic dogs were randomly assigned to two treatment groups. Both groups were treated with rFeIFN- $\omega$  (Virbagen<sup>®</sup> omega, Virbac, Carros, France). The first group (n = 15) received eight subcutaneous injections over four months. The second group (n = 11) received daily oral dosages. Concurrent medication was permitted, except systemically acting glucocorticoids and cyclosporins, which had to be withdrawn at least two weeks prior to the study. Vaccination was prohibited during the study. Dogs diagnosed with Morbus Cushing could not be included. Serum samples for antibody detection were

collected before and after the study. On the first day, after two months and after four months the dogs were examined and clinicians evaluated the skin lesions using a validated lesion score (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index = CADESI). Owners were asked to assess their dog's current pruritus with a validated pruritus score. Concurrent medications were recorded. For every visit a total score, consisting of CADESI, pruritus score and medication score was created. For antibody detection an indirect ELISA, using Virbagen® omega as antigen, was performed.

Comparison of pruritus scores, CADESI and total scores between days 0 and 120 showed improvement in both groups, however, significant improvement could only be detected in the oral group with CADESI and total scores (61 %,  $P = 0.0414$  and 36 %,  $P = 0.019$  respectively). There was no significant change in the mass extinction coefficient between samples from day 0 and 120 in both groups (s.c. group mean values 0.367 and 0.331,  $P = 0,33$  and oral group mean values 0.393 and 0.415,  $P = 0,68$  respectively), indicating that antibody development could not be demonstrated.

Thus, long-term therapy with subcutaneous administration as well as oral administration of rFeIFN- $\omega$  is possible. The results of this study indicate better efficacy with oral administration. The efficacy of oral administration should be further verified in larger, randomized, controlled studies.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. Cochrane Database Syst Rev 2003; CD001186.

Ahmed F, Jacobson IM, Herrera JL, Brand M, Wasserman RB, Fixelle AM, Rustgi VK, Albert C, Brown R, Brass C. Seizures during pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic Hepatitis C: observations from the WIN-R trial. J Clin Gastroenterol 2011; 45: 286-92.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. J Clin Invest 1998; 102: 98-106.

Akdis M, Akdis CA, Weigl L, Disch R, Blaser K. Skin-homing, CLA+ memory T cells are activated in atopic dermatitis and regulate IgE by an IL-13-dominated cytokine pattern: IgG4 counter-regulation by CLA- memory T cells. J Immunol 1997; 159: 4611-9.

Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Crameri R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. J Exp Med 2004; 199: 1567-75.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006; 124: 783-801.

Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Allergy Asthma Immunol Res 2011; 3: 11-20.

Aman MJ, Keller U, Derigs G, Mohamadzadeh M, Huber C, Peschel C. Regulation of cytokine expression by interferon-alpha in human bone marrow stromal cells: inhibition of hematopoietic growth factors and induction of interleukin-1 receptor antagonist. Blood 1994; 84: 4142-50.

Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 2012; 106: 9-14.

Amor KT, Ryan C, Menter A. The use of cyclosporine in dermatology: part I. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 925-46; quiz 47-8.

Arikawa J, Ishibashi M, Kawashima M, Takagi Y, Ichikawa Y, Imokawa G. Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 433-9.

Auxilia ST, Hill PB. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? *Vet Dermatol* 2000; 11: 247-54.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 563-91.

Bakker RA, Wieland K, Timmerman H, Leurs R. Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2000; 387: R5-7.

Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94: 557-72.

Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83: 851-7.

Beilharz MW, McDonald W, Watson MW, Heng J, McGeachie J, Lawson CM. Low-dose oral type I interferons reduce early virus replication of murine cytomegalovirus in vivo. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 625-30.

Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell



response: implications for its clinical use. *Immunol Today* 1996; 17: 369-72.

Bensignor E, Olivry T. Treatment of localized lesions of canine atopic dermatitis with tacrolimus ointment: a blinded randomized controlled trial. *Vet Dermatol* 2005; 16: 52-60.

Bermel RA, Rudick RA. Interferon-beta treatment for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 2007; 4: 633-46.

Bethlehem S, Bexley J, Mueller RS. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Vet Immunol Immunopathol* 2012;

Bizikova P, Linder KE, Paps J, Olivry T. Effect of a novel topical diester glucocorticoid spray on immediate- and late-phase cutaneous allergic reactions in Maltese-beagle atopic dogs: a placebo-controlled study. *Vet Dermatol* 2010; 21: 70-9.

Bjorneboe A, Soyland E, Bjorneboe GE, Rajka G, Drevon CA. Effect of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1987; 117: 463-9.

Boguniewicz M, Fiedler VC, Raimier S, Lawrence ID, Leung DY, Hanifin JM. A randomized, vehicle-controlled trial of tacrolimus ointment for treatment of atopic dermatitis in children. Pediatric Tacrolimus Study Group. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 637-44.

Bokenkamp A, Bohnhorst B, Beier C, Albers N, Offner G, Brodehl J. Nifedipine aggravates cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. *Pediatr Nephrol* 1994; 8: 181-5.

Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, Hehlmann R, Hochhaus A, Shepherd PC, Steegmann JL, Kluin-Nelemans HC, Thaler J,

Simonsson B, Louwagie A, Reiffers J, Mahon FX, Montefusco E, Alimena G, Hasford J, Richards S, Saglio G, Testoni N, Martinelli G, Tura S, Baccarani M. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood* 2001; 98: 3074-81.

Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 975-90.

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6: 468-75.

Bousquet J, Hejjaoui A, Skassa-Brociek W, Guerin B, Maasch HJ, Dhivert H, Michel FB. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. I. Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard grass-pollen extract. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 591-8.

Bousquet J, Hejjaoui A, Soussana M, Michel FB. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. IV. Comparison of the safety and efficacy of two dosages of a high-molecular-weight allergoid. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 490-7.

Brown Z, Neild GH, Willoughby JJ, Somia NV, Cameron SJ. Increased factor VIII as an index of vascular injury in cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1986; 42: 150-3.

Burchert A, Muller MC, Kostrewa P, Erben P, Bostel T, Liebler S, Hehlmann R, Neubauer A, Hochhaus A. Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1429-35.

Bussmann C, Weidinger S, Novak N. Genetics of atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; 9: 670-6.

Butterfield JH, Gleich GJ. Interferon-alpha treatment of six patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Ann Intern Med* 1994; 121: 648-53.

Byrne KP, Campbell KL, Davis CA, Schaeffer DJ, Troutt HF. The effects of dietary n-3 vs. n-6 fatty acids on ex-vivo LTB<sub>4</sub> generation by canine neutrophils. *Vet Dermatol* 2000; 11: 123-31.

Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978; 2: 1323-7.

Camp RD, Reitamo S, Friedmann PS, Ho V, Heule F. Cyclosporin A in severe, therapy-resistant atopic dermatitis: report of an international workshop, April 1993. *Br J Dermatol* 1993; 129: 217-20.

Cantell K, Pyhala L. Circulating interferon in rabbits after administration of human interferon by different routes. *J Gen Virol* 1973; 20: 97-104.

Carballada F, Boquete M, Nunez R, Lombardero M, de la Torre F. Follow-up of venom immunotherapy (VIT) based on conventional techniques and monitoring of immunoglobulin E to individual venom allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; 20: 506-13.

Carlotti DN, Boulet M, Ducret J, Machicote G, Jasmin P, Reme CA, Albouy M. The use of recombinant omega interferon therapy in canine atopic dermatitis: a double-blind controlled study. *Vet Dermatol* 2009; 20: 405-11.

Castelli JC, Hassel BA, Maran A, Paranjape J, Hewitt JA, Li XL, Hsu YT, Silverman RH, Youle RJ. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ* 1998; 5: 313-20.

Cave TA, Gault EA, Argyle DJ. Feline epitheliotropic T-cell lymphoma with paraneoplastic eosinophilia - immunochemotherapy with vinblastine and human

recombinant interferon alpha(2b). *Vet Comp Oncol* 2004; 2: 91-7.

Ceretelli S, Capochiani E, Petrini M. Interferon-alpha in the idiopathic hypereosinophilic syndrome: consideration of five cases. *Ann Hematol* 1998; 77: 161-4.

Chambers VV, Glaser J. The incidence of subsequent ragweed pollinosis in symptom-free persons having positive reactions to ragweed pollen extract. *J Allergy* 1958; 29: 249-57.

Chen CH, Yu ML. Evolution of interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hepat Res Treat* 2010; 2010: 140953.

Chen X, Regn S, Raffegerst S, Kolb HJ, Roskrow M. Interferon alpha in combination with GM-CSF induces the differentiation of leukaemic antigen-presenting cells that have the capacity to stimulate a specific anti-leukaemic cytotoxic T-cell response from patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 111: 596-607.

Chervet L, Galichet A, McLean WH, Chen H, Suter MM, Roosje PJ, Muller EJ. Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2010; 19: e343-6.

Choi MJ, Maibach HI. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am J Clin Dermatol* 2005; 6: 215-23.

Ciprandi G, Pronzato C, Passalacqua G, Ricca V, Grogan J, Mela GS, Varese P, Bertolini C, Bagnasco M, Canonica GW. Topical azelastine reduces eosinophil activation and intercellular adhesion molecule-1 expression on nasal epithelial cells: an antiallergic activity. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 1088-96.

Cockburn IT, Krupp P. The risk of neoplasms in patients treated with

cyclosporine A. *J Autoimmun* 1989; 2: 723-31.

Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998; 187: 2009-21.

Colombo S, Hill PB, Shaw DJ, Thoday KL. Effectiveness of low dose immunotherapy in the treatment of canine atopic dermatitis: a prospective, double-blinded, clinical study. *Vet Dermatol* 2005; 16: 162-70.

Colombo S, Hill PB, Shaw DJ, Thoday KL. Requirement for additional treatment for dogs with atopic dermatitis undergoing allergen-specific immunotherapy. *Vet Rec* 2007; 160: 861-4.

Conlon KC, Urba WJ, Smith JW, 2nd, Steis RG, Longo DL, Clark JW. Exacerbation of symptoms of autoimmune disease in patients receiving alpha-interferon therapy. *Cancer* 1990; 65: 2237-42.

Cook CP, Scott DW, Miller WH, Jr., Kirker JE, Cobb SM. Treatment of canine atopic dermatitis with cetirizine, a second generation antihistamine: a single-blinded, placebo-controlled study. *Can Vet J* 2004; 45: 414-7.

Cummins JM, Beilharz MW, Krakowka S. Oral use of interferon. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 853-7.

Cummins JM, Krakowka GS, Thompson CG. Systemic effects of interferons after oral administration in animals and humans. *Am J Vet Res* 2005; 66: 164-76.

Curtis C. Use and abuse of topical dermatological therapy in dogs and cats. Part 1. Shampoo therapy. *In Practice* 1998; 20: 244-51.

Dale BA, Holbrook KA, Steinert PM. Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature* 1978; 276: 729-31.

de Mari K, Maynard L, Eun HM, Lebreux B. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Vet Rec* 2003; 152: 105-8.

de Mari K, Maynard L, Sanquer A, Lebreux B, Eun HM. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 477-82.

De Vos C, Maleux MR, Baltes E, Gobert J. Inhibition of histamine and allergen skin wheal by cetirizine in four animal species. *Ann Allergy* 1987; 59: 278-82.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 271-6.

DeBoer DJ, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXI): antihistamine pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 323-9.

DeBoer DJ, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 239-49.

DeMora F, Garcia G, Puigdemont A, Arboix M, Ferrer L. Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflamm Res* 1996; 45: 424-7.

Deuter CM, Kotter I, Gunaydin I, Stubiger N, Doycheva DG, Zierhut M. Efficacy and tolerability of interferon alpha treatment in patients with chronic cystoid macular oedema due to non-infectious uveitis. *Br J Ophthalmol* 2009; 93: 906-13.

Dolen JG, Mathur A. Undetectable interferon-alpha serum levels in a patient with atopic dermatitis. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15: 973-5.

Doufexi A, Mina M, Ioannidou E. Gingival overgrowth in children: epidemiology, pathogenesis, and complications. A literature review. *J Periodontol* 2005; 76: 3-10.

Douglas RG, Jr., Betts RF. Effect of induced interferon in experimental rhinovirus infections in volunteers. *Infect Immun* 1974; 9: 506-10.

Drake LA, Ceilly RI, Cornelison RL, Dobes WA, Dorner W, Goltz RW, Lewis CW, Salasche SJ, Chanco Turner ML. Guidelines of care for atopic dermatitis. American Academy of Dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 485-8.

Dreborg S. Standardization of allergenic preparations by in vitro and in vivo methods. *Allergy* 1993; 48: 63-70.

Dupuy P, Bagot M, Michel L, Descourt B, Dubertret L. Cyclosporin A inhibits the antigen-presenting functions of freshly isolated human Langerhans cells in vitro. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 408-13.

Duquette P, Knobler RL, Lublin FD, et al. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1995; 45: 1277-85.

Eid P, Meritet JF, Maury C, Lasfar A, Weill D, Tovey MG. Oromucosal interferon therapy: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 157-69.

Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983; 80: 44s-9s.

Ewert G, Daems T. Treatment of canine atopic dermatitis by a fatty acid copolymer: comparative double blind study. *Prat Med Chir Anim Comp* 2001; 36: 401-8.

Ezepchuk YV, Leung DY, Middleton MH, Bina P, Reiser R, Norris DA. Staphylococcal toxins and protein A differentially induce cytotoxicity and release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 603-9.

Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A, Sundberg JP, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M, McLean WH. A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet* 2009; 41: 602-8.

Favrot C, Linek M, Mueller R, Zini E. Development of a questionnaire to assess the impact of atopic dermatitis on health-related quality of life of affected dogs and their owners. *Vet Dermatol* 2010a; 21: 63-9.

Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010b; 21: 23-31.

Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan NA. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 179-84.

Ferraccioli GF, Tomietto P, De Santis M. Rationale for T cell inhibition by cyclosporin A in major autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 658-65.

Field AK, Tytell AA, Lampson GP, Hilleman MR. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967; 58: 1004-10.



Finkelman FD, Svetic A, Gresser I, Snapper C, Holmes J, Trotta PP, Katona IM, Gause WC. Regulation by interferon alpha of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *J Exp Med* 1991; 174: 1179-88.

Flores I, Mariano TM, Pestka S. Human interferon omega (omega) binds to the alpha/beta receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 19875-7.

Flower RJ, Rothwell NJ. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 71-6.

Fontaine J, Olivry T. Treatment of canine atopic dermatitis with cyclosporine: a pilot clinical study. *Vet Rec* 2001; 148: 662-3.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-82.

Fu XY, Schindler C, Improtta T, Aebersold R, Darnell JE, Jr. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7840-3.

Gavutis M, Jaks E, Lamken P, Piehler J. Determination of the two-dimensional interaction rate constants of a cytokine receptor complex. *Biophys J* 2006; 90: 3345-55.

Geilen CC, Wieder T, Orfanos CE. Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 559-66.

Gibson DM, Cotler S, Spiegel HE, Colburn WA. Pharmacokinetics of recombinant leukocyte A interferon following various routes and modes of

administration to the dog. *J Interferon Res* 1985; 5: 403-8.

Giese T, Zeier M, Schemmer P, Uhl W, Schoels M, Dengler T, Buechler M, Meuer S. Monitoring of NFAT-regulated gene expression in the peripheral blood of allograft recipients: a novel perspective toward individually optimized drug doses of cyclosporine A. *Transplantation* 2004; 77: 339-44.

Gilger BC, Rose PD, Davidson MG, Roberts SM, Miller T. Low-dose oral administration of interferon-alpha for the treatment of immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 901-5.

Gold WM, Kessler GF, Yu DY, Frick OL. Pulmonary physiologic abnormalities in experimental asthma in dogs. *J Appl Physiol* 1972; 33: 496-501.

Golomb HM, Jacobs A, Fefer A, Ozer H, Thompson J, Portlock C, Ratain M, Golde D, Vardiman J, Burke JS, et al. Alpha-2 interferon therapy of hairy-cell leukemia: a multicenter study of 64 patients. *J Clin Oncol* 1986; 4: 900-5.

Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, Klammer M, Kapp A, Ruzicka T, Schopf E, Krutmann J. Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. *J Immunol* 1998; 161: 415-20.

Griffin CE, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 363-83.

Griffin CE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 255-69.

Gronemeyer H. Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J* 1992; 6: 2524-9.

Gross TL, Walder E, Ihrke P. Subepidermal bullous dermatosis due to topical

corticosteroid therapy in dogs. *Vet Dermatol* 1997; 8: 127-31.

Gruber W, Eber E, Mileder P, Modl M, Weinhandl E, Zach MS. Effect of specific immunotherapy with house dust mite extract on the bronchial responsiveness of paediatric asthma patients. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 176-81.

Guillaume-Czitrom S, Berger C, Pajot C, Bodaghi B, Wechsler B, Kone-Paut I. Efficacy and safety of interferon-alpha in the treatment of corticoid-dependent uveitis of paediatric Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 1570-3.

Gutzwiller ME, Brachelente C, Taglinger K, Suter MM, Weissenbock H, Roosje PJ. Feline herpes dermatitis treated with interferon omega. *Vet Dermatol* 2007; 18: 50-4.

Halliwel R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 207-8.

Halliwel RE. The localization of IgE in canine skin: an immunofluorescent study. *J Immunol* 1973; 110: 422-30.

Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1994; 94: 870-6.

Hamid Q, Naseer T, Minshall EM, Song YL, Boguniewicz M, Leung DY. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 225-31.

Hampel V, Schwarz B, Kempf C, Kostlin R, Schillinger U, Kuchenhoff H, Fenske N, Brill T, Hirschberger J. Adjuvant immunotherapy of feline fibrosarcoma with recombinant feline interferon-omega. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1340-6.

Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm*

Venereol 1980; 59: 44-7.

Hanifin JM, Schneider LC, Leung DY, Ellis CN, Jaffe HS, Izu AE, Bucalo LR, Hirabayashi SE, Tofte SJ, Cantu-Gonzales G, et al. Recombinant interferon gamma therapy for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 189-97.

Hardy MP, Owczarek CM, Jermini LS, Ejdeback M, Hertzog PJ. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics* 2004; 84: 331-45.

Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005; 35: 39-79, vi.

Hasegawa A, Sakurai T, Iwasaki T. A placebo-controlled, double-blinded study of recombinant interferon-gamma in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2004; 15: 1.

Havell EA, Berman B, Ogburn CA, Berg K, Paucker K, Vilcek J. Two antigenically distinct species of human interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 2185-7.

He JQ, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, Watson WT, Sandford AJ. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes Immun* 2003; 4: 385-9.

Heathcote J, Main J. Treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 2005; 12: 223-35.

Hill PB, Olivry T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 187-98.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (X): is there a relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food

reactions? *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 227-31.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 147-51.

Hillier A, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 289-304.

Hoare C, Li Wan Po A, Williams H. Systematic review of treatments for atopic eczema. *Health Technol Assess* 2000; 4: 1-191.

Hobbs DS, Pestka S. Purification and characterization of interferons from a continuous myeloblastic cell line. *J Biol Chem* 1982; 257: 4071-6.

Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 2006; 25: 349-60.

Hou CC, Griffin CE, Hill PB. *Dermatophagoides farinae*-specific IgG responses in atopic dogs undergoing allergen-specific immunotherapy with aqueous vaccines. *Vet Dermatol* 2008; 19: 215-20.

Hultsch T, Kapp A, Spergel J. Immunomodulation and safety of topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis. *Dermatology* 2005; 211: 174-87.

Ihara H, Nakanishi S. Selective inhibition of expression of the substance P receptor mRNA in pancreatic acinar AR42J cells by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1990; 265: 22441-5.

Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 1991; 96: 523-6.

Indraccolo S, Pfeffer U, Minuzzo S, Esposito G, Roni V, Mandruzzato S, Ferrari N, Anfosso L, Dell'Eva R, Noonan DM, Chieco-Bianchi L, Albini A, Amadori A. Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. *J Immunol* 2007; 178: 1122-35.

Indraccolo S. Interferon-alpha as angiogenesis inhibitor: learning from tumor models. *Autoimmunity* 2010; 43: 244-7.

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; 147: 258-67.

Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; 147: 268-73.

Isaacs A, Burke DC, Fadeeva L. Effect of interferon on the growth of viruses on the chick chorion. *Br J Exp Pathol* 1958; 39: 447-51.

Ishiwata K, Minagawa T, Kajimoto T. Clinical effects of the recombinant feline interferon-omega on experimental parvovirus infection in beagle dogs. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 911-7.

Ishizaka T, Ishizaka K, Tomioka H. Release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) by IgE-anti-IgE reactions on monkey mast cells. *J Immunol* 1972; 108: 513-20.

Ishizaka T, Conrad DH, Schulman ES, Sterk AR, Ishizaka K. Biochemical analysis of initial triggering events of IgE-mediated histamine release from human lung mast cells. *J Immunol* 1983; 130: 2357-62.

Itri LM, Campion M, Dennin RA, Palleroni AV, Gutterman JU, Groopman JE, Trown PW. Incidence and clinical significance of neutralizing antibodies in patients receiving recombinant interferon alfa-2a by intramuscular injection. *Cancer* 1987; 59: 668-74.

Iwasaki T, Hasegawa A. A randomized comparative clinical trial of recombinant canine interferon-gamma (KT-100) in atopic dogs using antihistamine as control. *Vet Dermatol* 2006; 17: 195-200.

Iwasaki T, Kagawa, Y., Park, S.J., Kanazawa, N., Momoi, Y. and Tanikawa, H. Effect of recombinant canine IFN $\gamma$  on canine atopic dermatitis evaluated by clinical signs, histopathology and expression of Th1/Th2 cytokine mRNA. *Veterinary Dermatology* 2004; 15: 1.

Jacobs L, O'Malley J, Freeman A, Ekes R. Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science* 1981; 214: 1026-8.

Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Host A, Koivikko A, Norberg LA, Valovirta E, Wahn U, Moller C. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 2007; 62: 943-8.

Jaeger K, Linek M, Power HT, Bettenay SV, Zabel S, Rosychuk RA, Mueller RS. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Vet Dermatol* 2010; 21: 118-22.

Jaitin DA, Roisman LC, Jaks E, Gavutis M, Piehler J, Van der Heyden J, Uze G, Schreiber G. Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 1888-97.

Jaks E, Gavutis M, Uze G, Martal J, Piehler J. Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol* 2007; 366: 525-39.

Jang IG, Yang JK, Lee HJ, Yi JY, Kim HO, Kim CW, Kim TY. Clinical improvement and immunohistochemical findings in severe atopic dermatitis treated with interferon gamma. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 1033-40.

Joss DV, Barrett AJ, Kendra JR, Lucas CF, Desai S. Hypertension and convulsions in children receiving cyclosporin A. *Lancet* 1982; 1: 906.

Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 323-31.

Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995; 154: 4187-94.

Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1205-14.

Kaplan AP, Kuna P. Chemokines and the late-phase reaction. *Allergy* 1998; 53: 27-32.

Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 1999; 189: 1451-60.

Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 123: 337-44.

Kerr IM, Brown RE. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75: 256-60.



Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, Grandchamp B, Chomienne C, Fenaux P. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* 2008; 112: 3065-72.

Kiladjian JJ, Mesa RA, Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 2011;

Kimata H, Akiyama Y, Kubota M, Furusho K. Interferon-alpha treatment for severe atopic dermatitis. *Allergy* 1995; 50: 837-40.

Kimura T, Doi K. Dorsal skin reactions of hairless dogs to topical treatment with corticosteroids. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 528-35.

Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 1987a; 40: 1256-65.

Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* 1987b; 40: 1249-55.

Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996; 14: 7-17.

Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, Smith TJ, Rao U, Steele M, Blum RH. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2444-58.

Kirkwood JM, Bender C, Agarwala S, Tarhini A, Shipe-Spotloe J, Smelko B, Donnelly S, Stover L. Mechanisms and management of toxicities associated with high-dose interferon alfa-2b therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3703-18.

Kluin-Nelemans HC, Jansen JH, Breukelman H, Wolthers BG, Kluin PM, Kroon HM, Willemze R. Response to interferon alfa-2b in a patient with systemic mastocytosis. *N Engl J Med* 1992; 326: 619-23.

Knobler RL, Panitch HS, Braheny SL, Sipe JC, Rice GP, Huddlestons JR, Francis GS, Hooper CJ, Kamin-Lewis RM, Johnson KP, et al. Clinical trial of natural alpha interferon in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1984; 436: 382-8.

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambda mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003; 4: 69-77.

Krause CD, Pestka S. Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacol Ther* 2005; 106: 299-346.

Krupp P, Monka C. Side-effect profile of cyclosporin A in patients treated for psoriasis. *Br J Dermatol* 1990; 122 Suppl 36: 47-56.

Lagente V, Carre C, Kyriacopoulos F, Boichot E, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Inhibitory effect of cyclosporin A on eosinophil infiltration in the guinea-pig lung induced by antigen, platelet-activating factor and leukotriene B<sub>4</sub>. *Eur Respir J* 1994; 7: 921-6.

Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 761-71.

Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, Gane E, Fried MW, Chow WC, Paik SW, Chang WY, Berg T, Flisiak R, McCloud P,

Pluck N. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2682-95.

Lesiak A, Kuna P, Zakrzewski M, van Geel M, Bladergroen RS, Przybylowska K, Stelmach I, Majak P, Hawro T, Sysa-Jedrzejowska A, Narbutt J. Combined occurrence of filaggrin mutations and IL-10 or IL-13 polymorphisms predisposes to atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2011; 20: 491-5.

Leung DY, Schneeberger EE, Siraganian RP, Geha RS, Bhan AK. The presence of IgE on macrophages and dendritic cells infiltrating into the skin lesion of atopic dermatitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 42: 328-37.

Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA, Hanifin JM, Sampson HA. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest* 1993; 92: 1374-80.

Leung DYM. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 104: S99-S108.

Leurs R, Vischer HF, Wijtmans M, de Esch IJ. En route to new blockbuster anti-histamines: surveying the offspring of the expanding histamine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32: 250-7.

Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1974; 90: 525-30.

Lim KH, Pardanani A, Butterfield JH, Li CY, Tefferi A. Cytoreductive therapy in 108 adults with systemic mastocytosis: Outcome analysis and response prediction during treatment with interferon-alpha, hydroxyurea, imatinib mesylate or 2-chlorodeoxyadenosine. *Am J Hematol* 2009; 84: 790-4.

Lindblad JH, Farr RS. The incidence of positive intradermal reactions and the

demonstration of skin sensitizing antibody to extracts of ragweed and dust in humans without history of rhinitis or asthma. *J Allergy* 1961; 32: 392-401.

Lippert U, Kruger-Krasagakes S, Moller A, Kiessling U, Czarnetzki BM. Pharmacological modulation of IL-6 and IL-8 secretion by the H1-antagonist decarboethoxy-loratadine and dexamethasone by human mast and basophilic cell lines. *Exp Dermatol* 1995; 4: 272-6.

Lockart RZ, Jr. Production of an Interferon by L Cells Infected with Western Equine Encephalomyelitis Virus. *J Bacteriol* 1963; 85: 556-66.

Loewenstein C, Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Vet Dermatol* 2009; 20: 84-98.

Loflath A, von Voigts-Rhetz A, Jaeger K, Schmid M, Kuechenhoff H, Mueller RS. The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus - a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Vet Dermatol* 2007; 18: 427-31.

Loignon M, Perret S, Kelly J, Boulais D, Cass B, Bisson L, Afkhamizarreh F, Durocher Y. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* 2008; 8: 65.

Lu M, Zhang W, Li Y, Berenzon D, Wang X, Wang J, Mascarenhas J, Xu M, Hoffman R. Interferon-alpha targets JAK2V617F-positive hematopoietic progenitor cells and acts through the p38 MAPK pathway. *Exp Hematol* 2010; 38: 472-80.

MacKie RM. Interferon-alpha for atopic dermatitis. *Lancet* 1990; 335: 1282-3.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of

chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-65.

Marsella R, Olivry T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXII): nonsteroidal anti-inflammatory pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 331-45.

Marsella R, Nicklin CF. Investigation on the use of 0.3% tacrolimus lotion for canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet Dermatol* 2002; 13: 203-10.

Marsella R, Nicklin C, Lopez J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol* 2006; 17: 306-12.

Marsella R, Samuelson D, Harrington L. Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Vet Dermatol* 2009; 20: 547-54.

Marsella R, Olivry T, Carlotti DN. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2011; 22: 239-48.

Marsh K, Ruedisueli F, Coe S, Watson T. Effects of zinc and linoleic acid supplementation on the skin and coat quality of dogs receiving a complete and balanced diet. *Vet Dermatol* 2000; 11: 277-84.

Martin V, Najbar W, Gueguen S, Grousseau D, Eun HM, Lebreux B, Aubert A. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Vet Microbiol* 2002; 89: 115-27.

Mascarell L, Truffa-Bachi P. New aspects of cyclosporin a mode of action: from gene silencing to gene up-regulation. *Mini Rev Med Chem* 2003; 3: 205-14.

Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Inoue R, Watanabe M, Kasahara K, Kondo N. Mutations of the IL-12 receptor beta2 chain gene in atopic subjects.

Biochem Biophys Res Commun 1999; 266: 551-5.

McCollum AD, Paik A, Eichenfield LF. The safety and efficacy of tacrolimus ointment in pediatric patients with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol* 2010; 27: 425-36.

McEwan NA. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2000; 68: 279-83.

McIntosh K. Interferon in nasal secretions from infants with viral respiratory tract infections. *J Pediatr* 1978; 93: 33-6.

Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008; 63: 1455-63.

Merryman-Simpson AE, Wood SH, Fretwell N, Jones PG, McLaren WM, McEwan NA, Clements DN, Carter SD, Ollier WE, Nuttall T. Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Vet Dermatol* 2008; 19: 59-66.

Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr* 1991; 121: 547-55.

Michalski WP, O'Rourke D, Bagust TJ. Chicken anaemia virus antibody ELISA: problems with non-specific reactions. *Avian Pathol* 1996; 25: 245-54.

Miller CC, McCreedy CA, Jones AD, Ziboh VA. Oxidative metabolism of dihomogammalinolenic acid by guinea pig epidermis: evidence of generation of anti-inflammatory products. *Prostaglandins* 1988; 35: 917-38.

Minagawa T, Ishiwata K, Kajimoto T. Feline interferon-omega treatment on canine parvovirus infection. *Vet Microbiol* 1999; 69: 51-3.

Miyazawa H, Saitoh S, Kumagai T, Yamanaka T, Yasuda S, Tsunetsugu-Yokota Y, Inouye S, Sakaguchi M. Specific IgG to gelatin in children with systemic immediate- and nonimmediate-type reactions to measles, mumps and rubella vaccines. *Vaccine* 1999; 17: 2176-80.

Moore BR, Krakowka S, Cummins JM, Robertson JT. Changes in airway inflammatory cell populations in standardbred racehorses after interferon-alpha administration. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 49: 347-58.

Morales CA, Schultz KT, DeBoer DJ. Antistaphylococcal antibodies in dogs with recurrent staphylococcal pyoderma. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 42: 137-47.

Mori A, Kaminuma O, Suko M, Inoue S, Ohmura T, Hoshino A, Asakura Y, Miyazawa K, Yokota T, Okumura Y, Ito K, Okudaira H. Two distinct pathways of interleukin-5 synthesis in allergen-specific human T-cell clones are suppressed by glucocorticoids. *Blood* 1997; 89: 2891-900.

Morris DO, Olivier NB, Rosser EJ. Type-1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. *Am J Vet Res* 1998; 59: 836-41.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.

Mrabet-Dahbi S, Dalpke AH, Niebuhr M, Frey M, Draing C, Brand S, Heeg K, Werfel T, Renz H. The Toll-like receptor 2 R753Q mutation modifies cytokine production and Toll-like receptor expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1013-9.

Mrowietz U, Farber L, Henneicke-von Zepelin HH, Bachmann H, Welzel D, Christophers E. Long-term maintenance therapy with cyclosporine and posttreatment survey in severe psoriasis: results of a multicenter study. German Multicenter Study. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 470-5.

Mueller RS, Bettenay SV. Evaluation of the safety of an abbreviated course of injections of allergen extracts (rush immunotherapy) for the treatment of dogs with atopic dermatitis. *Am J Vet Res* 2001; 62: 307-10.

Mueller RS. Topical dermatological therapy. In: Small Animal Clinical Pharmacology. Maddison JE, Page SW, Church D, eds. London: W.B. Saunders 2002: 535-45.

Mueller RS, Fieseler KV, Fettman MJ, Zabel S, Rosychuk RA, Ogilvie GK, Greenwalt TL. Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis. *J Small Anim Pract* 2004a; 45: 293-7.

Mueller RS, Fieseler KV, Zabel S, Rosychuk RAW. Conventional and rush immunotherapy in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2004b; 15: 4.

Mueller RS. [Treatment options for canine atopic dermatitis]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2010; 38: 229-37.

Nakajima A, Sokawa Y. Induction of blood 2',5'-oligoadenylate synthetase activity in mice by gastric administration of ovine IFN-tau. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 397-402.

Newton R, Kuitert LM, Slater DM, Adcock IM, Barnes PJ. Cytokine induction of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells. *Life Sci* 1997; 60: 67-78.

Niebuhr M, Mamerow D, Heratizadeh A, Satzger I, Werfel T. Staphylococcal alpha-toxin induces a higher T cell proliferation and interleukin-31 in atopic



dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 156: 412-5.

Nimmo Wilkie JS, Yager JA, Wilkie BN, Parker WM. Abnormal cutaneous response to mitogens and a contact allergen in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 28: 97-106.

Nogueira SAF, Torres SMF, Horne K, Jessen C. Patch test reactions to house dust mites in dogs with atopic dermatitis. In: *Advances in Veterinary Dermatology, Volume 5*. Hillier A, Foster AP, Kwochka W, eds. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 2005: 49-59.

Noh G, Lee KY. Successful interferon alpha therapy in atopic dermatitis of Besnier's prurigo pattern with normal serum IgE and blood eosinophil fraction: randomized case-controlled study. *Cytokine* 2001; 13: 124-8.

Noon L. Phrophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911; i: 1572-3.

Novak N, Kruse S, Kraft S, Geiger E, Kluken H, Fimmers R, Deichmann KA, Bieber T. Dichotomic nature of atopic dermatitis reflected by combined analysis of monocyte immunophenotyping and single nucleotide polymorphisms of the interleukin-4/interleukin-13 receptor gene: the dichotomy of extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 870-5.

Nuttall T, Mueller R, Bensignor E, Verde M, Noli C, Schmidt V, Reme C. Efficacy of a 0.0584% hydrocortisone aceponate spray in the management of canine atopic dermatitis: a randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Vet Dermatol* 2009; 20: 191-8.

Nuttall TJ, Thoday KL, van den Broek AH, Jackson HA, Sture GH, Halliwell RE. Retrospective survey of allergen immunotherapy in canine atopy. *Vet Rec* 1998; 143: 139-42.

Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. T-helper 1, T-helper 2

and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 379-84.

Oberg K, Alm G, Magnusson A, Lundqvist G, Theodorsson E, Wide L, Wilander E. Treatment of malignant carcinoid tumors with recombinant interferon alfa-2b: development of neutralizing interferon antibodies and possible loss of antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 531-5.

Ohe K, Takahashi T, Hara D, Hara M. Sensitivity of FCV to recombinant feline interferon (rFeIFN). *Vet Res Commun* 2008; 32: 167-74.

Okada AA. Immunomodulatory therapy for ocular inflammatory disease: a basic manual and review of the literature. *Ocul Immunol Inflamm* 2005; 13: 335-51.

Olivry T, Moore PF, Affolter VK, Naydan DK. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 579-85.

Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol* 1997; 19: 477-86.

Olivry T, Dean GA, Tompkins MB, Dow JL, Moore PF. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Exp Dermatol* 1999; 8: 204-11.

Olivry T, Hill PB. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 219-25.

Olivry T, Marsella R, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 347-62.

Olivry T, DeBoer DJ, Griffin CE, Halliwell RE, Hill PB, Hillier A, Marsella R,

Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 143-6.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 317-22.

Olivry T, Rivierre C, Jackson HA, Murphy KM, Davidson G, Sousa CA. Cyclosporine decreases skin lesions and pruritus in dogs with atopic dermatitis: a blinded randomized prednisolone-controlled trial. *Vet Dermatol* 2002a; 13: 77-87.

Olivry T, Steffan J, Fisch RD, Prelaud P, Guaguere E, Fontaine J, Carlotti DN. Randomized controlled trial of the efficacy of cyclosporine in the treatment of atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2002b; 221: 370-7.

Olivry T, Mueller RS. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2003; 14: 121-46.

Olivry T, Deboer DJ, Prelaud P, Bensignor E. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Vet Dermatol* 2007a; 18: 390-1.

Olivry T, Marsella R, Iwasaki T, Mueller R. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2007b; 18: 78-86.

Olivry T, Mueller R, Nuttall T, Favrot C, Prelaud P. Determination of CADESI-03 thresholds for increasing severity levels of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2008; 19: 115-9.

Olivry T, Deboer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prelaud P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 2010a;

Olivry T. New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 123-6.

Olivry T, Foster AP, Mueller RS, McEwan NA, Chesney C, Williams HC. Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Vet Dermatol* 2010b; 21: 4-22.

Olivry T. Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Vet Immunol Immunopathol* 2011;

Olivry T, Wofford J, Paps JS, Dunston SM. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Vet Dermatol* 2011; 22: 188-96.

Oran A, Marshall JS, Kondo S, Paglia D, McKenzie RC. Cyclosporin inhibits intercellular adhesion molecule-1 expression and reduces mast cell numbers in the asebia mouse model of chronic skin inflammation. *Br J Dermatol* 1997; 136: 519-26.

Paliogianni F, Raptis A, Ahuja SS, Najjar SM, Boumpas DT. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J Clin Invest* 1993; 91: 1481-9.

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38: 441-6.

Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987; 1: 893-5.

Panne D, Maniatis T, Harrison SC. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell* 2007; 129: 1111-23.

Park S, Ohya F, Yamashita K, Nishifuji K, Iwasaki T. Comparison of response to immunotherapy by intradermal skin test and antigen-specific IgE in canine atopy. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 983-8.

Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete G, Romagnani S. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* 1992; 149: 2977-83.

Pastorello EA. Skin tests for diagnosis of IgE-mediated allergy. *Allergy* 1993; 48: 57-62.

Paterson S. Additive benefits of EFAs in dogs with atopic dermatitis after partial response to antihistamine therapy. *J Small Anim Pract* 1995; 36: 389-94.

Pathak S, Palan U (2005) *Immunology: essential and fundamental*, 2nd edn. Science Publishers Inc., Enfield, NH, USA

Patterson R. Investigations of spontaneous hypersensitivity of the dog. *J Allergy* 1960; 31: 351-63.

Patterson R, Mellies CJ, Kelly JF, Harris KE. Airway responses of dogs with ragweed and ascaris hypersensitivity. *Chest* 1974; 65: 488-92.

Pazin GJ, Ho M, Haverkos HW, Armstrong JA, Breinig MC, Wechsler HL, Arvin A, Merigan TC, Cantell K. Effects of interferon-alpha on human warts. *J Interferon Res* 1982; 2: 235-43.

Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai K, Banchereau J, et al. IgE production by normal human lymphocytes is

induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6880-4.

Penzo C, Ross M, Muirhead R, Else R, Argyle DJ. Effect of recombinant feline interferon-omega alone and in combination with chemotherapeutic agents on putative tumour-initiating cells and daughter cells derived from canine and feline mammary tumours. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 222-9.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202: 8-32.

Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 2007; 282: 20047-51.

Picco F, Zini E, Nett C, Naegeli C, Bigler B, Rufenacht S, Roosje P, Gutzwiller ME, Wilhelm S, Pfister J, Meng E, Favrot C. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Vet Dermatol* 2008; 19: 150-5.

Plskova J, Greiner K, Forrester JV. Interferon-alpha as an effective treatment for noninfectious posterior uveitis and panuveitis. *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 55-61.

Powles AV, Hardman CM, Porter WM, Cook T, Hulme B, Fry L. Renal function after 10 years' treatment with cyclosporin for psoriasis. *Br J Dermatol* 1998; 138: 443-9.

Prélaud P, Guaguère E, Alhaidari Z, Faivre N, Héripret D, Gayerie A. Reevaluation of diagnostic criteria of canine atopic dermatitis. *Rev Med Vet* 1998; 149: 1057-64.

Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Maloisel F, Coiteux V, Gardembas M, Berthou C, Vekhoff A, Rea D, Jourdan E,

Allard C, Delmer A, Rousselot P, Legros L, Berger M, Corm S, Etienne G, Roche-Lestienne C, Eclache V, Mahon FX, Guilhot F. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2511-21.

Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T, Luthra R, Estrov Z, Pierce S, Richie MA, Borthakur G, Konopleva M, Cortes J, Verstovsek S. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5418-24.

Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 731-41.

Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 2004; 17 Suppl 1: 43-8.

Reidy L, Walls HC, Steele BW. Crossreactivity of bupropion metabolite with enzyme-linked immunosorbent assays designed to detect amphetamine in urine. *Ther Drug Monit* 2011; 33: 366-8.

Reinhold U, Wehrmann W, Kukel S, Kreysel HW. Evidence that defective interferon-gamma production in atopic dermatitis patients is due to intrinsic abnormalities. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 374-9.

Reitamo S, Wollenberg A, Schopf E, Perrot JL, Marks R, Ruzicka T, Christophers E, Kapp A, Lahfa M, Rubins A, Jablonska S, Rustin M. Safety and efficacy of 1 year of tacrolimus ointment monotherapy in adults with atopic dermatitis. The European Tacrolimus Ointment Study Group. *Arch Dermatol* 2000; 136: 999-1006.

Reiter LV, Torres SM, Wertz PW. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Vet Dermatol* 2009; 20: 260-6.

Renz H, Jujo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, Leung DY. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 403-8.

Ritz S, Egberink H, Hartmann K. Effect of feline interferon-omega on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1193-7.

Rizza P, Moretti F, Belardelli F. Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN-alpha: implications for cancer immunotherapy and autoimmunity. *Autoimmunity* 2010; 43: 204-9.

Robbins RA, Barnes PJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Geller DA, Polak JM. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 209-18.

Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997; 185: 825-31.

Rohatiner AZ, Gregory WM, Peterson B, Borden E, Solal-Celigny P, Hagenbeek A, Fisher RI, Unterhalt M, Arranz R, Chisesi T, Aviles A, Lister TA. Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2215-23.

Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of hymenoptera venom hypersensitivity: a meta-analysis. *Clin Ther* 2000a; 22: 351-8.

Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther* 2000b; 22: 342-50.



Rossbach K, Stark H, Sander K, Leurs R, Kietzmann M, Baumer W. The histamine H receptor as a new target for treatment of canine inflammatory skin diseases. *Vet Dermatol* 2009; 20: 555-61.

Rosser EJ, Jr. Diagnosis of food allergy in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 259-62.

Rudick RA, Goelz SE. Beta-interferon for multiple sclerosis. *Exp Cell Res* 2011;

Ruiz L, Reyes N, Aroche K, Tolosa V, Simanca V, Rogriguez T, Hardy E. Influence of packaging material on the liquid stability of interferon-alpha2b. *J Pharm Pharm Sci* 2005; 8: 207-16.

Ryan C, Amor KT, Menter A. The use of cyclosporine in dermatology: part II. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 949-72; quiz 73-4.

Rybnicek J, Lau-Gillard PJ, Harvey R, Hill PB. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 115-22.

Ryffel B, Donatsch P, Madorin M, Matter BE, Ruttimann G, Schon H, Stoll R, Wilson J. Toxicological evaluation of cyclosporin A. *Arch Toxicol* 1983; 53: 107-41.

Saevik BK, Bergvall K, Holm BR, Saijonmaa-Koulumies LE, Hedhammar A, Larsen S, Kristensen F. A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2004; 15: 137-45.

Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 2009; 122: 1285-94.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Gioulekas D, Leontidis L. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive

intra dermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 61-73.

Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Vet Dermatol* 2007; 18: 341-7.

Satoh Y, Kasama K, Kuwabara M, Yimin, Diao HY, Nakajima H, Kohanawa M, Minagawa T. Suppression of late asthmatic response by low-dose oral administration of interferon-beta in the guinea pig model of asthma. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 887-94.

Savan M, Angulo AB, Derbyshire JB. Interferon, antibody responses and protection induced by an intranasal infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *Can Vet J* 1979; 20: 207-10.

Schellekens H, Geelen G, Meritet JF, Maury C, Tovey MG. Oromucosal interferon therapy: relationship between antiviral activity and viral load. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21: 575-81.

Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007; 282: 20059-63.

Schnabl B, Bettenay SV, Dow K, Mueller RS. Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. *Vet Rec* 2006; 158: 81-5.

Schule R, Muller M, Kaltschmidt C, Renkawitz R. Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 1988; 242: 1418-20.

Schultz Larsen F, Diepgen T, Svensson A. The occurrence of atopic dermatitis in north Europe: an international questionnaire study. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 760-4.

Scott DW, Paradis M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec (1987-1988). *Can Vet J* 1990; 31: 830-5.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE (2001) *Small Animal Dermatology*, 6th edn. Saunders, Philadelphia

Scott IR, Harding CR. Studies on the synthesis and degradation of a high molecular weight, histidine-rich phosphoprotein from mammalian epidermis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 669: 65-78.

Sehgal VN, Jain S. Atopic dermatitis: nomenclature. *Int J Dermatol* 1993; 32: 575-6.

Sharma VK, Kalonia DS. Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon-alpha2a: possible implications in protein stability. *Pharm Res* 2003; 20: 1721-9.

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003; 4: 63-8.

Shida M, Kadoya M, Park SJ, Nishifuji K, Momoi Y, Iwasaki T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 19-31.

Shimada K, Yoon JS, Yoshihara T, Iwasaki T, Nishifuji K. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2009; 20: 541-6.

Shinohara N, Kumagai A, Kanagawa K, Maruyama S, Abe T, Sazawa A,

Nonomura K. Multicenter phase II trial of combination therapy with meloxicam, a cox-2 inhibitor, and natural interferon-alpha for metastatic renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2009; 39: 720-6.

Shinohara N, Abe T, Sazawa A, Maruyama S, Shindo J, Sato S, Suzuki S, Nonomura K. Interferon-alpha-based Immunotherapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients with the Primary Tumor In Situ. *Jpn J Clin Oncol* 2012; 42: 113-9.

Silverman RH. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 2007; 81: 12720-9.

Simons FE, Simons KJ. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 1139-50 e4.

Simou C, Thoday KL, Forsythe PJ, Hill PB. Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Vet Dermatol* 2005; 16: 385-91.

Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4562-6.

Sinke JD, Rutten VP, Willemse T. Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 351-6.

Siraganian RP. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 639-46.

Sousa CA, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 153-7.

Southerden P, Gorrel C. Treatment of a case of refractory feline chronic

gingivostomatitis with feline recombinant interferon omega. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 104-6.

Sperr WR, Agis H, Czerwenka K, Virgolini I, Bankl HC, Muller MR, Zsebo K, Lechner K, Valent P. Effects of cyclosporin A and FK-506 on stem cell factor-induced histamine secretion and growth of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 389-99.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-64.

Steffan J, Alexander D, Brovedani F, Fisch RD. Comparison of cyclosporine A with methylprednisolone for treatment of canine atopic dermatitis: a parallel, blinded, randomized controlled trial. *Vet Dermatol* 2003; 14: 11-22.

Steffan J, Favrot C, Mueller R. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol* 2006; 17: 3-16.

Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 4097-101.

Stevens SR, Hanifin JM, Hamilton T, Tofte SJ, Cooper KD. Long-term effectiveness and safety of recombinant human interferon gamma therapy for atopic dermatitis despite unchanged serum IgE levels. *Arch Dermatol* 1998; 134: 799-804.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-60.

Stroh A, Werckenthin C, Luis CS, Mueller RS. Influence of a phytosphingosine-containing chlorhexidine shampoo on superficial bacterial counts and bacterial adherence to canine keratinocytes. *Vet Microbiol* 2010; 141: 190-3.

Stubiger N, Winterhalter S, Pleyer U, Doycheva D, Zierhut M, Deuter C. [Janus-faced? : Effects and side-effects of interferon therapy in ophthalmology.]. *Ophthalmologie* 2011; 108: 204-12.

Sugiura H, Umemoto N, Deguchi H, Murata Y, Tanaka K, Sawai T, Omoto M, Uchiyama M, Kiriya T, Uehara M. Prevalence of childhood and adolescent atopic dermatitis in a Japanese population: comparison with the disease frequency examined 20 years ago. *Acta Derm Venereol* 1998; 78: 293-4.

Sweeney TM, Downing DT. The role of lipids in the epidermal barrier to water diffusion. *J Invest Dermatol* 1970; 55: 135-40.

Tahara E, Jr., Tahara H, Kanno M, Naka K, Takeda Y, Matsuzaki T, Yamazaki R, Ishihara H, Yasui W, Barrett JC, Ide T, Tahara E. G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 729-40.

Tarhini AA, Cherian J, Moschos SJ, Tawbi HA, Shuai Y, Gooding WE, Sander C, Kirkwood JM. Safety and Efficacy of Combination Immunotherapy With Interferon Alfa-2b and Tremelimumab in Patients With Stage IV Melanoma. *J Clin Oncol* 2012; 30: 322-8.

Tarpataki N, Papa K, Reiczigel J, Vajdovich P, Vorosi K. Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. *Acta Vet Hung* 2006; 54: 353-66.

Temizel EM, Cihan H, Akhtardanesh B, Aytug N. Effect of prednisolone and cetirizine on *D. farinae* and histamine-induced wheal and flare response in healthy dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2011; 39: 25-30.

Tengvall Linder M, Johansson C, Scheynius A, Wahlgren C. Positive atopy patch test reactions to *Pityrosporum orbiculare* in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 122-31.

Teunissen MB, De Jager MH, Kapsenberg ML, Bos JD. Inhibitory effect of cyclosporin A on antigen and alloantigen presenting capacity of human epidermal Langerhans cells. *Br J Dermatol* 1991; 125: 309-16.

Thestrup-Pedersen K. Clinical aspects of atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 535-43.

Thompson CB, June CH, Sullivan KM, Thomas ED. Association between cyclosporin neurotoxicity and hypomagnesaemia. *Lancet* 1984; 2: 1116-20.

Todd JD, Volenec FJ, Paton IM. Interferon in nasal secretions and sera of calves after intranasal administration of avirulent infectious bovine rhinotracheitis virus: association of interferon in nasal secretions with early resistance to challenge with virulent virus. *Infect Immun* 1972; 5: 699-706.

Tofte SJ, Hanifin JM. Current management and therapy of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: S13-6.

Tompkins WA. Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 817-28.

Tovey MG, Maury C. Oromucosal interferon therapy: marked antiviral and antitumor activity. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 145-55.

Tretter S, Mueller RS. The influence of topical unsaturated fatty acids and essential oils on normal and atopic dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011; 47: 236-40.

Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 2010; 207: 2053-63.

Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993; 14: 459-79.

Ueda Y, Sakurai T, Yanai A. Homogeneous production of feline interferon in silkworm by replacing single amino acid code in signal peptide region in recombinant baculovirus and characterization of the product. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 251-8.

Uze G, Monneron D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie* 2007; 89: 729-34.

Uze G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S. The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007; 316: 71-95.

van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 2006; 25: 361-72.

van der Bruggen T, Kanters D, Tool AT, Raaijmakers JA, Lammers JW, Verhoeven AJ, Koenderman L. Cytokine-induced protein tyrosine phosphorylation is essential for cytokine priming of human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 103-9.

van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. High frequency of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 389-94.

van Reijsen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JK, Mudde GC. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 184-93.

van Vuren PJ, Paweska JT. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay-based techniques for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in thermochemically inactivated sheep sera. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10: 697-9.



Veenhof EZ, Knol EF, Schlotter YM, Vernooij JC, Rutten VP, Willemse T. Characterisation of T cell phenotypes, cytokines and transcription factors in the skin of dogs with cutaneous adverse food reactions. *Vet J* 2011; 187: 320-4.

Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 1992; 70: 313-22.

von Hoegen P, Zawatzky R, Schirmacher V. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. III. Potentiation of tumor-specific cytolytic T cell activity via induction of interferon-alpha/beta. *Cell Immunol* 1990; 126: 80-90.

von Hoegen P. Synergistic role of type I interferons in the induction of protective cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Lett* 1995; 47: 157-62.

von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schafer G, Schirner M, Oberg K, Wiedenmann B, Hocker M, Rosewicz S. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 437-48.

von Wussow P, Freund M, Block B, Diedrich H, Poliwoda H, Deicher H. Clinical significance of anti-IFN-alpha antibody titres during interferon therapy. *Lancet* 1987; 2: 635-6.

Walter MR, Windsor WT, Nagabhushan TL, Lundell DJ, Lunn CA, Zauodny PJ, Narula SK. Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* 1995; 376: 230-5.

Watanabe T, Kuroda Y. The effect of a newly developed ointment containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. *J Med Invest* 1999; 46: 173-7.

Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Gauger A,

Darsow U, Jakob T, Novak N, Schafer T, Heinrich J, Behrendt H, Wichmann HE, Ring J, Illig T. Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 866-72.

Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CN, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WH, Novak N. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 214-9.

Weiss RC, Cox NR, Ostrom-Ram T. Effect of interferon or *Propionibacterium acnes* on the course of experimentally induced feline infectious peritonitis in specific-pathogen-free and random-source cats. *Am J Vet Res* 1990; 51: 726-33.

Werfel T, Breuer K, Rueff F, Przybilla B, Worm M, Grewe M, Ruzicka T, Brehler R, Wolf H, Schnitker J, Kapp A. Usefulness of specific immunotherapy in patients with atopic dermatitis and allergic sensitization to house dust mites: a multi-centre, randomized, dose-response study. *Allergy* 2006; 61: 202-5.

Wichmann O, Stark K, Shu PY, Niedrig M, Frank C, Huang JH, Jelinek T. Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 120.

Wilhem S, Kovalik M, Favrot C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2011; 22: 143-9.

Willemse A, Van den Brom WE, Rijnberk A. Effect of hyposensitization on atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 1277-80.

Willemse T. Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. *J Small Anim Pract* 1986; 27: 771-8.

Williams HC, Burney PG, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Hunter JJ, Bingham EA, Finlay AY, Pembroke AC, Graham-Brown RA, et al. The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1994; 131: 383-96.

Wills RJ, Spiegel HE, Soike KF. Pharmacokinetics of recombinant alpha A interferon following I.V. infusion and bolus, I.M., and P.O. administrations to African green monkeys. *J Interferon Res* 1984; 4: 399-409.

Winston DJ, Eron LJ, Ho M, Pazin G, Kessler H, Pottage JC, Jr., Gallagher J, Sartiano G, Ho WG, Champlin RE, et al. Recombinant interferon alpha-2a for treatment of herpes zoster in immunosuppressed patients with cancer. *Am J Med* 1988; 85: 147-51.

Wittich FW. Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal: Seasonal hay fever (fall type) in a dog. *J Allergy* 1941; 12: 247-51.

Wyss M, Scheitlin T, Stadler BM, Wuthrich B. Immunotherapy with aluminum hydroxide adsorbed insect venom extracts (Alutard SQ): immunologic and clinical results of a prospective study over 3 years. *Allergy* 1993; 48: 81-6.

Yasukawa K, Saito S, Kubo T, Shibasaki Y, Yamaoka K, Hachimura H, Kuyama T, Amimoto A, Kumata T, Kitahara Y, Takenaka M, Matsumura H, Uno T, Uchino T, Takehara K, Nishida K, Kadoya M, Sato M, Kato K, Matsumoto K, Shimoda T. Low-dose recombinant canine interferon-gamma for treatment of canine atopic dermatitis: an open randomized comparative trial of two doses. *Vet Dermatol* 2010; 21: 42-9.

Young EW, Ellis CN, Messana JM, Johnson KJ, Leichtman AB, Mihatsch MJ, Hamilton TA, Groisser DS, Fradin MS, Voorhees JJ. A prospective study of renal structure and function in psoriasis patients treated with cyclosporin. *Kidney Int* 1994; 46: 1216-22.

Zeidner NS, Myles MH, Mathiason-DuBard CK, Dreitz MJ, Mullins JI, Hoover

EA. Alpha interferon (2b) in combination with zidovudine for the treatment of presymptomatic feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1749-56.

Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 1993; 72: 753-65.

Ziboh VA, Miller CC, Cho Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 361S-6S.

Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, Von Mallinckrodt C, Wagner TO, Brade V, Kaufmann R. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 994-1000.

## IX. ANHANG

### Anhang 1: Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Dosierung von rFeIFN-<math>\omega</math> .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 2: Im ELISA verwendete Reagenzien .....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 3: Hunderassen und Anzahl .....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 4: CADESI-Werte der einzelnen Patienten der s.c. Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung .....</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 5: CADESI Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SA) der drei Kontrollbesuche, prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und P-Wert der s.c. Gruppe .....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 6: CADESI-Werte der einzelnen Patienten der oralen Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung .....</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 7: CADESI Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche, prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und P-Wert der oralen Gruppe .....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 8: Pruritus Scores der einzelnen Patienten der s.c. Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung .....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 9: Pruritus Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche, prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und P-Wert der s.c. Gruppe .....</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 10: Pruritus Scores der einzelnen Patienten der oralen Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung .....</i>	<i>64</i>
<i>Tabelle 11: Pruritus Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche, prozentuale Verbesserung zwischen erstem und letztem Besuch und P-Wert der oralen Gruppe .....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 12: Medication Scores aller Patienten der s.c. Gruppe bei den drei Studienbesuchen .....</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 13: Medication Score Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche inkl. P-Wert (Vergl. 1. und 3. Besuch) der s.c. Gruppe .....</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 14: Medication Scores aller Patienten der oralen Gruppe bei den drei Studienbesuchen .....</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 15: Medication Score Mittelwerte und Standardabweichungen der drei</i>	

<i>Kontrollbesuche inkl. P-Wert (Vergl. 1. und 3. Besuch) der oralen Gruppe .....</i>	<i>70</i>
<i>Tabelle 16: Gesamtscores der einzelnen Patienten der s.c. Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung .....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 17: Gesamtscore Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche inkl. prozentuale Verbesserung und P-Wert (Vergl. 1. und 3. Besuch) der s.c. Gruppe .....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 18: Gesamtscores der einzelnen Patienten der oralen Gruppe inkl. prozentualer Verbesserung bzw. Verschlechterung .....</i>	<i>74</i>
<i>Tabelle 19: Gesamtscore Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kontrollbesuche inkl. prozentuale Verbesserung und P-Wert (Vergl. 1. und 3. Besuch) der oralen Gruppe .....</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 20: Global Assessment Scores der Patienten der s.c. Gruppe (0 = Verschlechterung, 1 = keine Veränderung, 2 = leichte Verbesserung, 3 = zufriedenstellende Verbesserung, 4 = vollständiger Rückgang der Symptomatik), inkl. Mittelwerte.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 21: Global Assessment Scores der Patienten der oralen Gruppe (0 = Verschlechterung, 1 = keine Veränderung, 2 = leichte Verbesserung, 3 = zufriedenstellende Verbesserung, 4 = vollständiger Rückgang der Symptomatik), inkl. Mittelwerte.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 22: Punktzahl der Lebensqualitäts-Fragebögen der einzelnen Hunde der s.c. Gruppe (maximal erreichbare Punktzahl: 60).....</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 23: Punktzahl der Lebensqualitäts-Fragebögen der einzelnen Hunde der oralen Gruppe (maximal erreichbare Punktzahl: 60).....</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 24: Extinktionen (450-595 nm) der einzelnen Patienten der s.c. Gruppe</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 25: Extinktionen (450-595 nm) der einzelnen Patienten der oralen Gruppe .....</i>	<i>85</i>
<i>Tabelle 26: Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Extinktionen (450-595 nm) .....</i>	<i>86</i>

**Anhang 2: Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1: Pathogenese der atopischen Dermatitis (LOEWENSTEIN &amp; MUELLER, 2009). .....</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 2: Verteilung der CADESIs der s.c. Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert.....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 3: Verteilung der CADESIs der oralen Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert .....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 4: Verteilung der Pruritus Scores der s.c. Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert .....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 5: Verteilung der Pruritus Scores der oralen Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert .....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 6: Verteilung der Gesamtscores der s.c. Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert .....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 7: Verteilung der Gesamtscores der oralen Gruppe bei den Kontrollbesuchen mit jeweiligem Mittelwert .....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 8: Mittelwerte der Extinktionen (450-595 nm) der s.c. Gruppe .....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 9: Mittelwerte der Extinktionen (450-595 nm) der oralen Gruppe.....</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 10: Mittels Coomassie-Blau angefärbte Proteinbanden nach Auftrennung von Virbagen® omega mittels SDS-Page .....</i>	<i>88</i>

**Anhang 3: Kriterien zur Diagnose der CAD (FAVROT et al., 2010b)**

	<u>Liste 1:</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Beginn der Symptomatik in einem Alter unter drei Jahren</li> <li>2. der Hund hält sich überwiegend im Haus auf</li> <li>3. Glukokortikoid-responsiver Juckreiz</li> <li>4. chronische oder wiederkehrende Hefepilzinfektionen</li> <li>5. die Vorderbeine sind mitbetroffen</li> <li>6. die Ohrmuscheln sind mitbetroffen</li> <li>7. die Ohrränder sind nicht betroffen</li> <li>8. die dorso-lumbale Region ist nicht mitbetroffen</li> </ol>			
	<u>Liste 2:</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Beginn der Symptomatik in einem Alter unter drei Jahren</li> <li>2. der Hund hält sich überwiegend im Haus auf</li> <li>3. zu Beginn bestand Juckreiz ohne Läsionen</li> <li>4. die Vorderbeine sind mitbetroffen</li> <li>5. die Ohrmuscheln sind mitbetroffen</li> <li>6. die Ohrränder sind nicht betroffen</li> <li>7. die dorso-lumbale Region ist nicht mitbetroffen</li> </ol>			
	5 Kriterien sind erfüllt		6 Kriterien sind erfüllt	
	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität
CAD sensu stricto				
Liste 1	85 %	79 %	58 %	89 %
Liste 2	77 %	83 %	42 %	94 %
CAD durch Futtermittelallergie				
Liste 1	80 %	86 %	54 %	86 %
Liste 2	70 %	86 %	36 %	100 %



**Anhang 4: Einverständniserklärung****Einverständniserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich über die Studie „*Bildung von Antikörpern gegen felines Interferon omega bei Hunden mit atopischer Dermatitis*“ aufgeklärt wurde. Ich verstehe, dass mein Tier an einem klinischen Versuch teilnimmt. Diese Studie bewertet die Langzeittauglichkeit der neuen Therapiemöglichkeit von umweltallergischen Hunden mit rekombinantem felinem Interferon- $\omega$  (Virbagen® omega). Mittels einer Blutuntersuchung wird bestimmt, ob Hunde Antikörper gegen das Medikament bilden, die eine Therapie mit Interferon auf längere Sicht untauglich machen würden.

Zusätzlich gebe ich mein Einverständnis, dass bei meinem Hund beim ersten Besuch und nach 4 Monaten jeweils 10 ml Blut entnommen werden.

Ich wurde über potentielle Risiken (Nebenwirkungen von Virbagen® omega It. Hersteller: Fieber, Erbrechen, leichtgradige und vorübergehende Veränderungen des Blutbildes) und Nutzen der Studie (Verbesserung der therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten bei Allergien) aufgeklärt.

Weiterhin werde ich im Rahmen der mir zur Verfügung stehenden Möglichkeiten die Vorgaben der Studie erfüllen. Ich werde mein Tier 2 und 4 Monate nach Studienbeginn zu Kontrolluntersuchungen vorstellen und das Medikament regelmäßig, wie laut Studienprotokoll vorgeschrieben, verabreichen.

Das Medikament Virbagen® omega sowie die im Rahmen der Studie durchgeführten Kontrollen sind für mich kostenlos, solange ich den Anforderungen der Studie nachkomme. Für über das Studienprotokoll hinaus gehende Untersuchungen und Behandlungen werden keine Kosten übernommen. Ebenso wenig werden Kosten für während der Studie weitergeführte Therapien (Antihistaminika, Fettsäuren, Shampoos, Desensibilisierungslösung etc.) übernommen. Sollte ich aus der Studie ausscheiden, bzw. nach 4 Monaten nicht zur abschließenden Kontrolle und 2. Blutentnahme erscheinen, wird mir für die Kosten des Virbagen® omega sowie die Kontrollbesuche eine Rechnung zugeschickt.

Ich bin mit den hier genannten Bedingungen einverstanden.

Name, Vorname

---

Tiername

---

Datum

---

Unterschrift

---

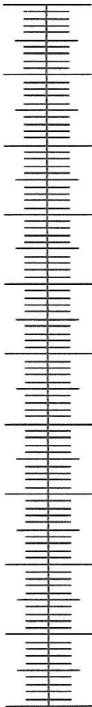
**Anhang 5: CADESI (OLIVRY et al., 2007b; OLIVRY et al., 2008)**

SITE \ CLINICAL SIGNS			Erythema	Lichenification	Excoriations	Alopecia	TOTAL
Face	Preauricular						
	Periocular						
	Perilabial						
	Muzzle						
	Chin						
Head	Dorsal						
Ear Pinna	Left	Convex					
		Concave					
	Right	Convex					
		Concave					
Neck	Dorsal						
	Ventral						
	Lateral	Left					
		Right					
Axilla	Left						
	Right						
Sternum							
Thorax	Dorsal						
	Lateral	Left					
		Right					
Inguinal	Left						
	Right						
Abdomen							
Lumbar	Dorsal						
Flank	Left						
	Right						
Front Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
Front Foot	Left	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
Hind Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
Hind Foot	Left	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
Perianal							
Perigenital							
Tail	Ventral						
	Dorsal						
grade each sign at each location as follows: 0 (none), 1 (mild), 2, 3 (moderate), 4, 5 (severe)			TOTAL Score (1240 maximum)				

## Anhang 6: Juckreizskala (RYBNICEK et al., 2009)

### Juckreizskala

Markieren Sie bitte die durchschnittliche Juckreizstärke Ihres Hundes auf der folgenden Skala von 0 bis 10. Juckreiz kann sich äußern als: Kratzen, beißen, kauen, lecken, scheuern und knabbern.

	<p>Extrem heftiges Kratzen / fast ununterbrochen Egal was passiert, das Kratzen wird nicht unterbrochen, auch im Behandlungszimmer (der Hund muss z.B. durch Halskragen am Kratzen gehindert werden)</p> <p>Heftiges Kratzen / langanhaltende Episoden Kratzen bei Nacht (wenn beobachtet) <b>und</b> beim Fressen, Spielen, Spazieren gehen oder bei Ablenkung</p> <p>Moderates Kratzen / episodische Kratzt bei Nacht (wenn beobachtet), <b>aber nicht</b> beim Fressen, Spielen, Spazieren gehen oder bei Ablenkung</p> <p>Mildes Kratzen / etwas vermehrt Kratzt <b>nicht</b> nachts, beim Fressen, Spielen, Spazieren gehen oder bei Ablenkung</p> <p>Sehr mildes Kratzen / nur gelegentliche Episoden Der Hund kratzt sich nur etwas mehr als zu der Zeit bevor die Hautproblematik begonnen hat</p> <p>Normaler Hund- ich glaube nicht, dass das Kratzen ein Problem darstellt</p>
--	---

**Anhang 7: Medication Score (MUELLER et al., 2004a)****Medication Score**

Welche Art der Therapie hat Ihr Hund in den letzten zwei Wochen erhalten?

- ☐ keine Medikamente
- ☐ äußerliche Behandlung (Shampoo, Salbe, Cortavance-Spray)  
Welche: \_\_\_\_\_
- ☐ Antihistaminika (Histacalmine, Cetirizin, Fenistil)  
Welche: \_\_\_\_\_
- ☐ Fettsäuren (Viacutan, Öl ins Futter, Dermoscent Spot-on oder Spray, Douxo Spot-on)  
Welche: \_\_\_\_\_
- ☐ Kortison (Prednisolon)  
Dosierung: \_\_\_\_\_
- ☐ Zyklosporin (Atopica)  
Dosierung: \_\_\_\_\_

**Anhang 8: Global Assessment Score****Global Assessment**

Bitte beurteilen Sie den Gesamtzustand Ihres Hundes im Vergleich zum letzten Besuch.

- ☐ Verschlechterung
- ☐ keine Veränderung
- ☐ leichte Verbesserung
- ☐ zufriedenstellende Verbesserung
- ☐ vollständiger Rückgang der Symptomatik

**Anhang 9: Fragebogen zur Lebensqualität der Hunde (FAVROT et al., 2010a)****Fragebogen zur Lebensqualität**

Die Krankheit meines Hundes hat meine eigene Lebensqualität oder die Lebensqualität meiner Familie eingeschränkt.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

Die Krankheit meines Hundes hat seine eigene Lebensqualität eingeschränkt.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

1) Dank meines Hundes bin ich aktiver.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

2) Sich um die Hautprobleme meines Hundes zu kümmern ist eine große Last für mich.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

3) Die Krankheit meines Hundes macht mich traurig.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

- 4) Die Hautprobleme meines Hundes haben mein normales Familienleben verändert.
- a) Trifft überhaupt nicht zu.
  - b) Trifft nicht zu.
  - c) Trifft weder zu noch nicht zu.
  - d) Trifft zu.
  - e) Trifft absolut zu.
- 5) Ich kann meinen Hund nicht der Obhut anderer überlassen wegen seiner Hautprobleme.
- a) Trifft überhaupt nicht zu.
  - b) Trifft nicht zu.
  - c) Trifft weder zu noch nicht zu.
  - d) Trifft zu.
  - e) Trifft absolut zu.
- 6) Ich muss bei anderen Sachen sparen, um die Behandlung meines Hundes zu bezahlen.
- a) Trifft überhaupt nicht zu.
  - b) Trifft nicht zu.
  - c) Trifft weder zu noch nicht zu.
  - d) Trifft zu.
  - e) Trifft absolut zu.
- 7) Mein Hund wacht nachts auf um sich zu kratzen, beißen, lecken.
- a) Trifft überhaupt nicht zu.
  - b) Trifft nicht zu.
  - c) Trifft weder zu noch nicht zu.
  - d) Trifft zu.
  - e) Trifft absolut zu.
- 8) Mein Hund ist glücklich.
- a) Trifft überhaupt nicht zu.
  - b) Trifft nicht zu.
  - c) Trifft weder zu noch nicht zu.
  - d) Trifft zu.
  - e) Trifft absolut zu.
- 9) Mein Hund ist verspielt und aktiv.
- a) Trifft überhaupt nicht zu.
  - b) Trifft nicht zu.
  - c) Trifft weder zu noch nicht zu.
  - d) Trifft zu.
  - e) Trifft absolut zu.



10) Mein Hund schläft gut.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

11) Die Hautprobleme haben das Verhalten meines Hundes negativ beeinflusst.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

12) Mein Hund ist müde aufgrund seiner Erkrankung.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

13) Die Behandlung an sich (Shampoos, Tabletten etc.) ist eine große Belastung für meinen Hund.

- a) Trifft überhaupt nicht zu.
- b) Trifft nicht zu.
- c) Trifft weder zu noch nicht zu.
- d) Trifft zu.
- e) Trifft absolut zu.

**Anhang 10: Im ELISA verwendete Materialien/Reagenzien mit Hersteller**

	Bezeichnung	Hersteller
96-Loch-ELISA-Platten	96 Well Immuno Platten, transparent, F96, PolySorp	NUNC GmbH, Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Bovines Serum Albumin	BSA-50, 50g, Albumin, Bovine Serum (BSA), Fraction V (Immunoglobulin and Protease Free)	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
PBS	Phosphate buffered saline (P5368) - BioReagent, pH7.4, for molecular biology	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Probenverdünner	Reagent Diluent Concentrate 2 (10x)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Peroxidase-konjugierter Zweitantikörper gegen canines IgG	F(ab') <sub>2</sub> Anti-DOG IgG [H&L] (RABBIT) Antibody Peroxidase Conjugated	Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, USA - bezogen über BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
PBS-T	Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

TMB-Substrat	TMB ready to use ELISA substrate	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
ELISA-Reader	ELISA-Reader Synergy HT	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Parafilm	Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

## **X. DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Ralf Müller bedanken, dafür, dass er bereits während des Studiums mein Interesse an der Dermatologie geweckt hat, mir eine Stelle als Doktorandin in der Abteilung für Dermatologie und Allergologie der Medizinischen Kleintierklinik angeboten hat und mir dieses Thema zur Verfügung stellte. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und erweiterte mein dermatologisches Fachwissen beträchtlich. Die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht!

Bei Frau Dr. Karin Weber möchte ich mich für die Unterstützung bei der Laborarbeit bedanken. Ihr Fachwissen und die praktische Unterstützung und Anleitung im Labor wurden von mir sehr geschätzt.

Frau Prof. Katrin Hartmann danke ich für die Möglichkeit diese Doktorarbeit an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München zu erstellen.

Bei den Mitarbeitern des physiologischen Instituts der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und bei Gudrun Treutlein bedanke ich mich für die Durchführung der SDS-PAGE. Margarete Swadzba aus dem physiologischen Institut möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie mir meine Fragen zu Laborangelegenheiten sehr ausführlich und interessiert beantwortet hat.

Den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie, Campus Forschung N 27, Universitäts-Klinikum Hamburg Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg und insbesondere Herrn Dr. Buck möchte ich für die Durchführung der Massenspektrometrie und die ausführliche Beantwortung aller meiner Fragen danken.

Ein großes Dankeschön geht an die Deutsche Gesellschaft für Veterinärdermatologie (DGVD) für die Bereitstellung eines großzügigen Grants. Ohne diese finanzielle Hilfe wäre die Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen.

Bei der Firma Virbac möchte ich mich für die Bereitstellung eines Großteils des Studienmedikamentes Virbagen<sup>®</sup> omega bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Derma-Team bedanken. Insbesondere bei Frau Dr. Ana Rostaher, Frau Dr. Cornelia Johansen und Herrn Dr. Stefan Hobi, meinen Residents, für die wundervolle Zusammenarbeit und die Unterstützung und Hilfe bei den Studienpatienten. Außerdem bei meinen Doktoranden-Kollegen Svenja Budach, Kathrin Hatzmann, Juliane Schilling und Michaela Blaskovic für die Hilfe beim Sammeln und Betreuen der Studienpatienten, sowie für die moralische Unterstützung und eine sehr lustige Zeit! Zu guter Letzt möchte ich natürlich die gute Seele der Abteilung für Dermatologie nicht vergessen, Amelie von Voigts-Rhetz. Vielen Dank für all Deine Hilfe (insbesondere bei schwierigen Patienten ;-)!

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Studienpatienten und deren Besitzern – ohne ihre Mithilfe wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Bei meinen Eltern und bei meinem Bruder möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die uneingeschränkte Unterstützung in jeder Lebenslage – insbesondere auch für das Korrekturlesen der Dissertation! Ich hab Euch lieb!